

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y
BIOMEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Desarrollo de nanosistemas con base lipídica como transportadores
de fármacos para el tratamiento de enfermedades**

PhD THESIS

**Development of lipid-based drug delivery systems
for the treatment of diseases**

Realizada por:

Lourdes Valdivia Fernández

Dirigida por:

**Dra. Mónica López Fanarraga
Dr. Rafael Valiente Barroso**

ESCUELA DE DOCTORADO DE LA UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

**Santander
2021**

"Sólo aquellos que tengan la firme determinación de que nada les impedirá conseguir su propósito, serán los que, con perseverancia y valor, se harán con los laureles de la victoria. Para aquellos que luchan con fuerza y constancia, los sueños se convierten en objetivos y los objetivos en logros y realidades".

J. Murphy

Dña. Mónica López Fanarraga, Catedrática del Dpto. de Biología Molecular, y D. Rafael Valiente Barroso, Profesor Titular del Dpto. de Física Aplicada, directores de la Tesis Doctoral de D^a. Lourdes Valdivia Fernández

INFORMAN:

Que el trabajo que se presenta en la Memoria, titulada *Desarrollo de nanosistemas con base lipídica como transportadores de fármacos para el tratamiento de enfermedades*, ha sido realizado bajo su dirección en el contexto del Grupo de Nanomedicina de la Universidad de Cantabria-IDIVAL, dentro del programa de doctorado en Biología Molecular y Biomedicina, y que el contenido reúne los requisitos necesarios para su presentación como Memoria de Doctorado para poder optar al título de Doctor por la Universidad de Cantabria. Por tanto, se emite la conformidad para que esta memoria sea presentada y tenga lugar, posteriormente, la correspondiente Lectura y Defensa.

Santander, 17 de marzo de 2021

Fdo.: Mónica López Fanarraga

Fdo: Rafael Valiente Barroso

Esta Tesis ha sido financiada gracias a:

- Proyecto de investigación PI16/00496, PI19/00349 y DTS19/00033; Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad. Fondos FEDER.
- Proyectos INNVAL17/11, INNVAL19/12 e INNVAL 20/13 del Instituto de investigación Marqués de Valdecilla (IDIVAL).
- Ayudas para la formación de profesorado universitario (FPU), convocatoria 2015, referencia: FPU 15/06881, Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades.

Agradecimientos

Cuando uno visualiza un objetivo sueña con alcanzarlo exitosamente y más si ese camino resulta duro y eterno. Pero cuando se echa la vista atrás se da cuenta de que lo realmente importante no fue el momento de cruzar la meta sino la enorme experiencia que ha hecho posible llegar hasta ese punto y la gente que te ha ayudado a lograrlo. Además, si este camino ha resultado tan enriquecedor como frustrante, todo lo que te rodea tiene una importancia especial que probablemente no vuelvas a experimentar, sumado a la vivencia peculiar de compartir una pandemia mundial con la finalización de este trabajo.

Por este motivo quiero agradecer, en primer lugar, a mis directores, Mónica y Rafael, por vuestra ayuda, tanto en el ámbito científico como con vuestros sabios consejos hablándome y guiándome siempre desde la experiencia, muchas gracias. También agradecer al grupo de Nanomedicina, siempre dispuestos a ayudar en lo que he necesitado. Es un lujo contar con un grupo tan multidisciplinar y experimentado, gracias.

Cuando aterricé aquí no podía imaginar que en estos años iba a tener una nueva familia venida de los cuatro puntos cardinales tan variopinta, pero tan especial y maravillosa. Gracias a mis "hermanos de la ciencia", los que no han faltado ni en lo bueno ni en lo malo, con lo que me llevo no solo una amistad, mucho más que eso porque las experiencias vividas han sido tan intensas que no pueden describirse en estas líneas. Por suerte siempre quedan en el recuerdo. Gracias a Deb, Nerea, Espe, Elena, Carlos, Ana(s), Lorena(s) y Elo, un placer haberos conocido.

Muchas gracias también al Dr. Manuel Bañobre y a su grupo por darme esa amable acogida y traerme una experiencia tan provechosa (científica y personal). Gracias a Juan, Efres, Stefania (compañera de viajes), Silvia, Nuria, Vera, Catia, Marta, Milene, Víctor, Teresa y Raquel por su ayuda y por haberme hecho ser una más desde el primer día. A todos vosotros, *muito obrigada*.

Al IDIVAL, gracias al personal de administración por su dedicación y disponibilidad y por el apoyo técnico de la mano de Fidel Madrazo en el Servicio de Microscopía.

A mis padres Jose y Lourdes y a mi hermana Cristi, por su apoyo incondicional desde la distancia, este último año, más lejos que nunca, pero a la vez tan cerca. Gracias por

hacerme seguir adelante y por vuestro ánimo constante.

Por último, agradecer a la persona que ha vivido este período de mi vida de principio a fin, a jornada completa y en primera persona. Luis, en estas líneas no puedo alcanzar a decirte lo que te agradezco la paciencia y el incansable apoyo que me has dado cada día y sobre todo por tu confianza ciega en mí. Por tu incansable cariño, mil gracias.

A todos vosotros, muchas gracias.

Índice general

Índice de tablas	XVII
------------------	------

Índice de figuras	XIX
-------------------	-----

1. Introducción	1
1.1. Nanotecnología y Nanomedicina	1
1.2. Liberación de fármacos. Tipos de nanosistemas	3
1.3. Nanosistemas lipídicos	8
1.4. Partículas sólidas lipídicas	12
1.4.1. Composición de las partículas sólidas lipídicas	13
1.4.2. Encapsulación de fármacos en las partículas sólidas lipídicas . . .	15
1.4.3. Técnicas de síntesis de las partículas sólidas lipídicas	17
1.4.4. Caracterización de las partículas sólidas lipídicas	17
1.4.5. Características de las partículas sólidas lipídicas	20
1.4.6. Aplicaciones de las partículas sólidas lipídicas	22
1.5. Liposomas	24
1.5.1. Clasificación de los liposomas	25
1.5.2. Composición de los liposomas	27
1.5.3. Técnicas de síntesis de los liposomas	29
1.5.4. Encapsulación de fármacos en los liposomas	31
1.5.5. Caracterización de los liposomas	33
1.5.6. Características de los liposomas	33

1.5.7.	Aplicaciones de los liposomas	34
1.6.	Tratamiento del cáncer metastásico empleando la Nanomedicina	36
1.6.1.	Cáncer metastásico	36
1.6.2.	Nanosistemas de transporte de fármacos frente al cáncer metastásico	39
1.6.3.	Vehiculización de antineoplásicos en partículas sólidas lipídicas .	41
1.6.4.	Doxorrubicina encapsulada en nanotransportadores lipídicos . . .	45
1.7.	Tratamiento de infecciones intracelulares empleando la Nanomedicina . .	47
1.7.1.	Bacterias intracelulares	49
1.7.2.	Tratamiento actual frente a microorganismos intracelulares. Problemas de eficacia	50
1.7.3.	Nanosistemas frente a infecciones intracelulares: “Nanoantibióticos”	52
1.7.4.	Nanotransportadores basados en lípidos frente a infecciones intracelulares	54
1.7.5.	Antimicrobianos encapsulados: cloranfenicol	55
1.7.6.	Cloranfenicol encapsulado en nanotransportadores de fármacos frente a infecciones intracelulares	56
1.7.7.	Antimicrobianos encapsulados: enrofloxacin	57
1.7.8.	Enrofloxacin encapsulada en nanotransportadores de fármacos frente a infecciones intracelulares	59
2.	Objetivos	61
3.	Materiales y Métodos	63
3.1.	Síntesis de Nanomateriales	63
3.1.1.	Nanopartículas de óxido de hierro	63
3.1.2.	Partículas sólidas lipídicas	64
3.1.3.	Liposomas	66
3.2.	Caracterización de los nanomateriales	67
3.2.1.	Potencial zeta	67

ÍNDICE GENERAL

3.2.2.	Tamaño	68
3.2.3.	Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	69
3.2.4.	Microscopía electrónica de barrido (SEM)	69
3.2.5.	Nanopartículas de óxido de hierro: morfología y propiedades magnéticas	70
3.3.	Eficiencia de encapsulación y perfil de liberación	71
3.3.1.	Eficiencia de encapsulación de la doxorubicina en las partículas sólidas lipídicas	71
3.3.2.	Eficiencia de encapsulación de la enrofloxacin en las partículas sólidas lipídicas	72
3.3.3.	Eficiencia de encapsulación del cloranfenicol en los liposomas	73
3.3.4.	Ensayo de liberación de la doxorubicina en PBS <i>in vitro</i>	73
3.3.5.	Ensayo de liberación de la enrofloxacin y del cloranfenicol <i>in vitro</i>	75
3.3.6.	Modelos cinéticos: modelo Korsmeyer-Peppas	76
3.4.	Ensayos <i>in vitro</i> en cultivos celulares	77
3.4.1.	Soluciones	77
3.4.2.	Líneas celulares	77
3.4.3.	Microscopía de fluorescencia	78
3.4.4.	Inmunofluorescencia	79
3.4.5.	Microscopía de contraste de fases	80
3.4.6.	Preparación de muestras celulares para microscopía electrónica de transmisión	80
3.4.7.	Viabilidad celular	81
3.5.	<i>Listeria monocytogenes</i> 10403S como modelo de bacteria intracelular	82
3.5.1.	Cepa bacteriana	82
3.5.2.	Soluciones	82
3.5.3.	Preparación de <i>stock</i> de bacterias	82
3.5.4.	Diseño de infección intracelular con <i>L. monocytogenes</i>	83

3.5.5.	Extracción de bacteria <i>L. monocytogenes</i> y cuantificación de unidades formadoras de colonias.	84
3.6.	Ensayos <i>in vivo</i> en modelos murinos	84
3.6.1.	Modelo animal	84
3.6.2.	Modelo tumoral	85
3.6.3.	Inhibición del crecimiento tumoral en pulmones	85
3.6.4.	Supresión de la formación de cáncer metastásico en pulmones . .	86
3.6.5.	Cortes y tinción de hematoxilina-eosina de pulmones metastásicos	86
3.6.6.	Cuantificación del área pulmonar afectada por metástasis	88
3.6.7.	Biodistribución de las partículas sólidas lipídicas con nanopartículas de óxido de hierro	89
3.7.	Análisis de resultados	89
4.	Resultados y Discusión	91
4.1.	Tratamiento frente a cáncer metastásico	91
4.1.1.	Síntesis de las partículas sólidas lipídicas	92
4.1.2.	Caracterización de las partículas sólidas lipídicas	93
4.1.3.	Eficiencia de encapsulación y perfil de liberación de las SLPs cargadas con doxorubicina.	95
4.1.4.	Liberación de doxorubicina en cultivos celulares de melanoma murino.	98
4.1.5.	Localización intracelular de las partículas sólidas lipídicas en células de melanoma	99
4.1.6.	Ensayo de la biodistribución de las partículas sólidas lipídicas . .	99
4.1.7.	Puesta a punto y optimización del modelo tumoral	102
4.1.8.	Inhibición del crecimiento metastásico tumoral mediante el tratamiento con partículas sólidas lipídicas	103
4.1.9.	Supresión de la formación de metástasis pulmonar mediante el tratamiento con partículas sólidas lipídicas	105
4.1.10.	Estudio de toxicidad de las partículas sólidas lipídicas	107
4.1.11.	Estudio de disminución del peso de los ratones	107

4.2. Diseño de sistemas de encapsulación frente a infecciones intracelulares	110
4.2.1. Síntesis de las partículas sólidas lipídicas cargadas con enrofloxacin	110
4.2.2. Caracterización de las partículas sólidas lipídicas	112
4.2.3. Eficiencia de encapsulación y perfil de liberación de las SLPs cargadas con enrofloxacin	114
4.2.4. Síntesis de liposomas cargados con cloranfenicol	117
4.2.5. Caracterización de los liposomas	118
4.2.6. Eficiencia de encapsulación y perfil de liberación de los liposomas cargados con cloranfenicol	119
4.2.7. Interacción de los nanosistemas de transporte de fármacos sintetizados con macrófagos murinos	122
4.2.8. Localización intracelular de las partículas sólidas lipídicas en macrófagos	124
4.2.9. Puesta a punto de un modelo de infección intracelular en cultivos celulares. Ensayos <i>in vitro</i> procariota-eucariota	124
4.2.10. Citotoxicidad de los nanosistemas cargados de antibiótico	125
4.2.11. Eficacia terapéutica de los nanosistemas cargados de antibiótico <i>in vitro</i>	127
5. Conclusions	131
6. Perspectivas Futuras	133
7. Artículos	137
Referencias	139

Índice de tablas

1.1. Medicamentos basados en Nanotecnología aprobados por la FDA	9
1.2. Medicamentos basados en Nanotecnología aprobados por la FDA (cont.).	10
1.3. Compuestos más utilizados en la síntesis de partículas sólidas lipídicas (SLPs)	14
1.4. Técnicas de síntesis de partículas sólidas lipídicas	18
1.5. Técnicas de síntesis de partículas sólidas lipídicas (cont.)	19
1.6. Medicamentos basados en liposomas aprobados por la FDA	28
1.7. Ejemplos de fosfolípidos empleados en la síntesis de liposomas.	29
1.8. Formulaciones liposomales cargadas con doxorrubicina de uso clínico. . .	46
1.9. Formulaciones lipídicas cargadas con doxorrubicina.	47
3.1. Interpretación del exponente de difusión y el mecanismo de liberación del fármaco correspondiente según el modelo matemático de Korsmeyer-Peppas y en base a la geometría del sistema de liberación.	77
4.1. Medidas de potencial zeta y de tamaño de las SLPs cargadas con enrofloxacin frente a las SLPs control.	112
4.2. Medidas de potencial zeta y de tamaño de las SLPs cargadas con enrofloxacin y con NPs de Fe_3O_4 @AO frente a las SLPs control.	113
4.3. Medidas de potencial zeta y de tamaño de los liposomas cargados con cloranfenicol frente a los liposomas control.	119

Índice de figuras

1.1. Tamaños y comparaciones de escala.	2
1.2. Aplicaciones de la Nanomedicina.	3
1.3. Clasificación de los nanotransportadores atendiendo a su naturaleza. . . .	4
1.4. Propiedades en el diseño de los nanotransportadores de fármacos.	5
1.5. Relación entre Farmacocinética y Farmacodinámica.	6
1.6. Clasificación de los tipos de nanosistemas lipídicos más empleados. . . .	11
1.7. Tipos de encapsulación de fármaco en las partículas sólidas lipídicas. . .	17
1.8. Clasificación de liposomas según su tamaño y el número de bicapas que presentan.	25
1.9. Clasificación de liposomas según su funcionalización superficial para la aplicación en la administración y liberación de fármacos	26
1.10. Diferentes métodos de síntesis de liposomas	31
1.11. Transporte pasivo y activo de los nanosistemas transportadores de fármacos hacia un tumor por efecto EPR.	34
1.12. Desarrollo de un cáncer metastásico.	37
1.13. Estructura química de la doxorrubina. Este fármaco intercalándose entre las cadenas de ADN.	44
1.14. Mecanismos de resistencias de las bacterias al tratamiento con antibióticos.	49
1.15. Inconvenientes de la eficacia terapéutica de los antibióticos frente a infec- ciones intracelulares.	51
1.16. Complejo formado por la unión del cloranfenicol a la subunidad 50s del ribosoma	55
1.17. Unión del ciprofloxacino (metabolito de la enrofloxacina) a la ADN-girasa	58

3.1. Síntesis de NPs de Fe_3O_4 estabilizadas con ácido oleico (AO) por el método de co-precipitación.	64
3.2. Síntesis de partículas sólidas lipídicas por el método de fusión-emulsión modificado.	65
3.3. Esquema donde se muestran los distintos pasos del proceso de síntesis de liposomas cargados con antibiótico.	67
3.4. Esquema representativo de la diferencia de potencial como una función de la distancia desde la superficie de una partícula suspendida en un medio de dispersión	68
3.5. Microfotografías de las NPs de Fe_3O_4 @AO sintetizadas observadas por microscopía TEM. Histograma con la distribución de tamaños de las NPs.	70
3.6. Propiedades magnéticas de las nanopartículas sintetizadas.	71
3.7. Ensayo <i>in vitro</i> de liberación de fármaco de las partículas empleando el método de diálisis.	74
3.8. Espectros de fluorescencia de la doxorubicina en PBS a distintas concentraciones para realizar la curva patrón o curva de calibrado.	75
3.9. Diagrama donde se representan las diferencias entre la microscopía de fluorescencia y la microscopía de fluorescencia confocal.	79
3.10. Diseño de infección de macrófagos con la bacteria intracelular modelo: <i>Listeria monocytogenes</i>	83
3.11. Esquema de extracción de la bacteria intracelular y posterior cuantificación de UFCs/mL	84
3.12. Desarrollo del modelo de metástasis pulmonares en ratón.	85
3.13. Imagen de los órganos del ratón tras 20 días post-inyección de células de melanoma.	86
3.14. Proceso de tinción de muestras con hematoxilina y eosina	88
3.15. Método de estimación cuantitativa de metástasis en pulmones de ratón.	88
4.1. Esquema de las SLPs cargadas con doxorubicina sintetizadas por el método de fusión-emulsión modificado con las cantidades de los componentes añadidos en la síntesis.	93
4.2. Medidas de potencial zeta y de tamaño de las SLPs cargadas con doxorubicina frente a las SLPs control.	94
4.3. Imágenes de TEM y de SEM de las SLPs sintetizadas.	94
4.4. Representación gráfica de la recta obtenida por fluorimetría.	96

4.5. Representación gráfica de la recta obtenida por absorbancia.	96
4.6. Gráfica de liberación de la doxorrubicina frente al tiempo en medio fisiológico (PBS).	97
4.7. Ajuste al modelo cinético de Korsmeyer-Peppas de la liberación de la doxorrubicina frente al tiempo en medio fisiológico (PBS).	98
4.8. Liberación de doxorrubicina de las SLPs cargadas con el fármaco (SLPs-DOX) en cultivos celulares <i>in vitro</i> . Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de células de melanoma murino tratadas con SLP-DOX durante 2, 16 y 48 horas.	99
4.9. Imagen obtenida por microscopía electrónica de transmisión de las partículas sólidas lipídicas tras 48 horas de incubación con células de melanoma murino B16-F10.	100
4.10. Biodistribución de las SLPs tras 3 y 8 horas post-inyección intravenosa. .	101
4.11. Biodistribución de las SLPs tras 20 días post-inyección intravenosa. . . .	101
4.12. Esquema que representa el diseño del estudio de inhibición tumoral. . . .	103
4.13. Fotografías de los pulmones en fresco y secciones de los mismos, teñidos con hematoxilina y eosina.	104
4.14. Cuantificación del área afectada por metástasis pulmonar en el experimento de inhibición metastásica.	105
4.15. Esquema del estudio <i>in vivo</i> de la supresión en la formación de metástasis pulmonar.	105
4.16. Cuantificación del área afectada por metástasis pulmonar en el experimento de supresión metastásica.	106
4.17. Representación gráfica de la toxicidad del tratamiento tras 20 días de estudio tras el trasplante con células de melanoma murino.	107
4.18. Representación gráfica de la pérdida de peso de los ratones a los que se le generó la metástasis con los diferentes grupos de tratamiento durante los 20 días de estudio.	108
4.19. Simulación de los niveles de doxorrubicina tras la administración de diferentes dosis de las SLPs en modelos <i>in vivo</i>	109
4.20. Esquema de las SLPs cargadas con enrofloxacin sintetizadas por el método de fusión-emulsión modificado con las cantidades de los componentes añadidos en la síntesis.	111
4.21. Esquema de las SLPs cargadas con enrofloxacin y con NPs de Fe ₃ O ₄ @AO sintetizadas por el método de fusión-emulsión modificado con las cantidades de los componentes añadidos en la síntesis.	112

4.22. Imágenes de TEM y de SEM de las SLPs sintetizadas.	113
4.23. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de las SLPs con nanopartículas de Fe_3O_4 @AO.	114
4.24. Espectros de absorción de la enrofloxacin en medio lisosomal sintético (pH= 4,5) para distintas concentraciones.	115
4.25. Representación gráfica de la recta patrón de la enrofloxacin midiendo la absorbancia de la enrofloxacin a 270 nm (PBS).	115
4.26. Representación gráfica de la recta patrón de la enrofloxacin midiendo la absorbancia de la enrofloxacin a 277 nm (medio lisosomal).	116
4.27. Ajuste al modelo cinético de Korsmeyer-Peppas de la liberación (%) de la enrofloxacin frente al tiempo en medio fisiológico (PBS) y en medio lisosomal.	116
4.28. Esquema de los liposomas cargados con cloranfenicol sintetizados por el método de hidratación del <i>film</i> modificado.	118
4.29. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de los liposomas sintetizados.	119
4.30. Espectros de absorción del cloranfenicol en metanol para distintas concentraciones.	120
4.31. Recta de calibrado del cloranfenicol en metanol.	121
4.32. Recta de calibrado del cloranfenicol en medios fisiológicos.	121
4.33. Ajuste al modelo cinético de Korsmeyer-Peppas de la liberación (%) del cloranfenicol frente al tiempo en medio fisiológico (PBS) y en medio lisosomal sintético.	122
4.34. Imágenes de microscopía de fluorescencia confocal donde se muestra la interacción de las SLPs y de los liposomas sintetizados en cultivos celulares de macrófagos murinos tras 5 y 24 horas de incubación.	123
4.35. Imágenes de microscopía de fluorescencia confocal donde se muestra la interacción de las SLPs y de los liposomas sintetizados en cultivos celulares de macrófagos murinos tras 48 y 72 horas de incubación.	123
4.36. Imágenes de TEM de macrófagos murinos con SLPs incubadas durante 24 y 72 horas.	125
4.37. Imágenes de microscopía confocal de los cultivos procariota-eucariota. . .	126
4.38. Cuantificación de la supervivencia celular tras 72 horas de tratamiento con la enrofloxacin encapsulada.	126
4.39. Cuantificación de la supervivencia celular tras 72 horas de tratamiento con el cloranfenicol encapsulado	127

4.40. Cuantificación de la supervivencia intracelular de <i>L. monocytogenes</i> después del tratamiento con enrofloxacin encapsulada	128
4.41. Cuantificación de la supervivencia intracelular de <i>L. monocytogenes</i> después del tratamiento con cloranfenicol encapsulado	129
6.1. Diseño de infección intracelular con la bacteria modelo <i>L. monocytogenes</i> en ratones.	133
6.2. Imágenes de microscopía confocal de criosecciones de bazo de ratón infectado con la bacteria <i>L. monocytogenes</i> tras tres días post-inoculación.	134
6.3. Imágenes de microscopía confocal de criosecciones de hígado de ratón infectado con la bacteria <i>L. monocytogenes</i> tras tres días post-inoculación.	134

Acrónimos

ADME	<i>Absorción, distribución, metabolismo y excreción</i>	DOPS	<i>Diioleoylphosphatidylserine</i>
ADN	<i>Ácido desoxirribonucleico</i>	DOX	<i>Doxorubicina</i>
ARN	<i>Ácido ribonucleico</i>	DPPE	<i>1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine</i>
AO	<i>Ácido oleico</i>	DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>
BCRP	<i>Breast cancer resistance protein</i>	EE	<i>Efficiency encapsulation</i>
BHI	<i>Brain-Heart Infusion</i>	EPR	<i>Efecto de permeabilidad y retención</i>
BOE	<i>Boletín oficial del estado</i>	ESKAPE	<i>Enterococcus spp., Staphylococcus spp., Klebsiella spp., Acinetobacter spp., Pseudomonas spp., Enterobacter spp.</i>
CCR	<i>Carcinoma colorrectal</i>	FDA	<i>Food and drug administration</i>
CLSI	<i>Clinical & laboratory standards institute</i>	GA	<i>Ácido Gálico</i>
CMI	<i>Concentración mínima inhibitoria</i>	P-gp	<i>Glicoproteína-P</i>
DHA	<i>Docosa-hexaenoic-acid</i>	HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
DiI	<i>1,1'-Diioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate</i>	HDAC	<i>Histona desacetilasa</i>
DiO	<i>3,3'-Diioctadecyloxacarbocyanine Perchlorate</i>	HLB	<i>Hydrophilic-lipophilic balance</i>
DiR	<i>1,1'-Diioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindotricarbocyanine Iodide</i>	HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
DL	<i>Drug loading</i>	HSPC	<i>Hydrogenated soybeanphosphatidylcholine</i>
DLS	<i>Dynamic light scattering</i>	ICP-OES	<i>Inductively coupled plasma optical emission spectroscopy</i>
DMPG	<i>1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phospho-rac-(1-glycerol) sodium salt</i>	IFN	<i>Interferón</i>
DMSO	<i>Dimetilsulfóxido</i>	IL-2	<i>Interleucina-2</i>
DOPE	<i>1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine</i>	IMDM	<i>Iscoe's Modified Dulbecco's Medium</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

INL	<i>International Iberian Nanotechnology Laboratory</i>	PX	<i>Paclitaxel</i>
IP	<i>Intraperitoneal</i>	RES	<i>Reticuloendothelial system</i>
LED	<i>Light-emitting diodes</i>	ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
LUV	<i>Large unilamellar vesicle</i>	SBF	<i>Suero bovino fetal</i>
MDR	<i>Multidrug resistance</i>	SC	<i>Subcutánea</i>
MRP	<i>Multidrug resistance protein</i>	SEEA	<i>Servicio de estabulación y experimentación animal</i>
MLV	<i>Multilaminar vesicle</i>	SEM	<i>Scanning electron microscopy</i>
MRI	<i>Magnetic resonance imaging</i>	SIDA	<i>Síndrome de inmunodeficiencia adquirida</i>
MTO	<i>Mitoxantrona</i>	SLP	<i>Solid lipid particle</i>
MVV	<i>Multivesicular vesicle</i>	SUV	<i>Small unilamellar vesicle</i>
NIR	<i>Near-infrared</i>	TC	<i>Transition temperature</i>
NLC	<i>Nanostructured lipid carrier</i>	TEM	<i>Transmission electron microscopy</i>
NP	<i>Nanopartícula</i>	UE	<i>Unión europea</i>
OMS	<i>Organización Mundial de la Salud</i>	UFC	<i>Unidad formadora de colonias</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>	UV-VIS	<i>Ultravioleta-visible</i>
PBS-T	<i>Phosphate buffered saline + Tritón</i>	VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
PEG	<i>Polietilenglycol</i>		
PGA	<i>Polyglycolic acid</i>		
PLGA	<i>poly(lactic-co-glycolic acid)</i>		

Abstract

In recent years, nanomedicine has acquired great importance in different areas of medical research. The use of drug delivery systems is one of the most studied fields. Nanomedicine has been proposed as a possible solution for the development of new controlled drug release systems using nanostructures that transport the drug to specific pharmacological targets. Lipid-based nanosystems, such as liposomes or, more recently discovered, solid lipid nanoparticles, have demonstrated, in various studies, high efficiency and versatility in drug encapsulation. Both nanosystems allow the encapsulation of compounds with different chemical nature. Furthermore, these nanostructures are one of the most biocompatible and biodegradable nanosystems due to their high lipid composition similar to physiological components.

In this study, two lipid nanocarriers have been developed and three different drugs have been chosen for encapsulation, one antineoplastic (Doxorubicin) and two antimicrobials (Chloramphenicol and Enrofloxacin). All of them are extended due to their toxicity and low pharmacokinetic profile. The tests *in vitro* and *in vivo* of these nanosystems have demonstrated the ability to improve characteristics such as bioavailability or efficacy. They also show a reduction of toxicity when drugs have been transported within these lipid nanocarriers. Furthermore, this Thesis shows how the use of nanosystems in the administration of drugs can improve the treatment of plenty different diseases from metastatic lung cancer to a chronic infection caused by intracellular bacteria. In both cases, it has been possible to design an alternative drug delivery system that has improved bioavailability, both in *in vitro* tests and in *in vivo* models of these lipophilic drugs.

Introducción

1.1. Nanotecnología y Nanomedicina

La primera vez que se habló del empleo de los materiales a escala nanométrica fue cuando el físico y ganador del Premio Nobel de Física Richard Feynman predijo en 1959 las oportunidades que presentaba la manipulación de la materia a una escala atómica y molecular [1]. No obstante, el término Nanotecnología no fue usado hasta 1974 por el ingeniero, y también ganador del Nobel, Norio Taniguchi [2]. Este término hace referencia a un campo multidisciplinar que se encarga del estudio, el diseño, la síntesis, así como la aplicación de materiales y sistemas funcionales a través del control de la materia a nivel de la nanoescala [3], es decir, en nanómetros, siendo éste una mil millonésima parte de un metro (10^{-9} metros) (Fig.1.1). Al manipular la materia, a escala nanométrica, esta puede presentar fenómenos y propiedades totalmente nuevas y, es que, lo interesante de la nanotecnología es el estudio de las propiedades físicas y químicas únicas de las nanoestructuras (p.ej. las propiedades de superficie, la reología, la conductividad eléctrica, el magnetismo, la reactividad, el punto de fusión o las propiedades biológicas), que son muy diferentes si las comparamos con los materiales a mayor escala [4–6].

En los últimos años, la Nanotecnología ha tomado una enorme importancia en distintas áreas de investigación, en concreto en las áreas de la salud como la Biología y la Medicina. La convergencia de la Nanotecnología con otras disciplinas como las Ciencias de los Materiales, la Biología Celular y Molecular o las Ciencias Farmacéuticas ha propiciado toda una revolución tecnológica que se vislumbra como una de las de mayor impacto en el futuro debido a sus potenciales aplicaciones en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades [7, 8]. Esta combinación del empleo de la Nanotecnología y de diversas disciplinas basadas en la Medicina es lo que se conoce como Nanomedicina [9].

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

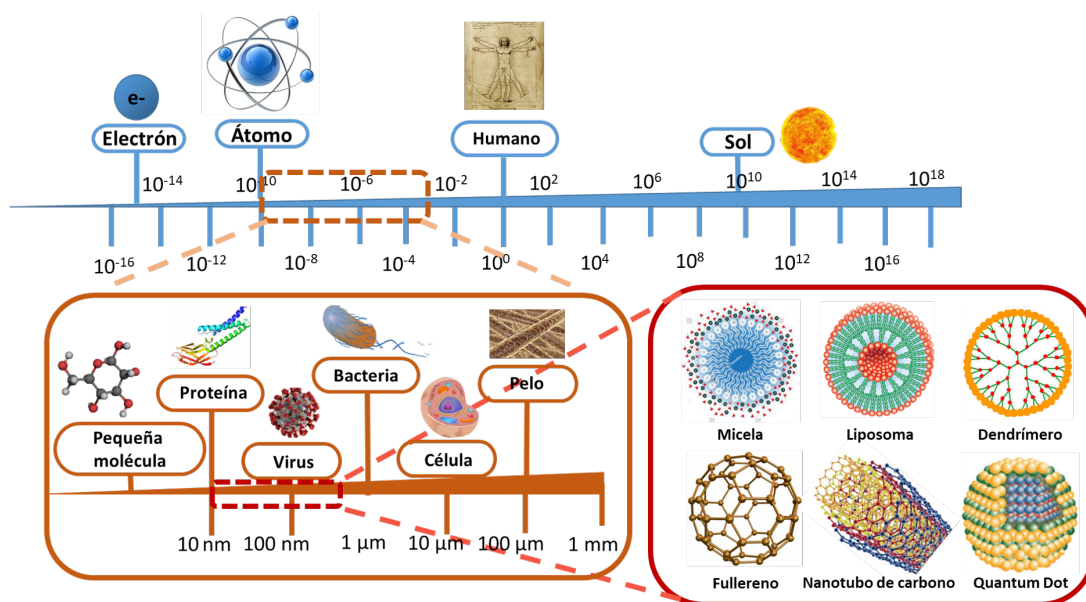


Figura 1.1: Tamaños y comparaciones de escala.

Dicho concepto según la organización *The European Science Foundation*, se define como la aplicación de la Nanotecnología al diagnóstico, la prevención y el tratamiento de enfermedades y, en consecuencia, al entendimiento de los procesos pato-fisiológicos que intervienen en el origen y curso de una enfermedad determinada [10]. Esta definición abarca las 3 áreas principales en las que se centra la Nanomedicina (Fig.1.2):

1. Liberación de fármacos. Se enfoca en el diseño y desarrollo de materiales nanoestructurados para construir sistemas que transporten y vehiculicen fármacos de manera controlada [11].
2. Diagnóstico. Esta rama de la Nanomedicina se enfoca en el diseño de nanodispositivos con la finalidad de identificar una enfermedad a nivel celular o molecular. Estos nanodispositivos pueden ser:
 - a) Nanobiosensores: En este campo se han logrado enormes avances en el diseño de biosensores mediante el empleo de diferentes tipos de nanomateriales. Las prestaciones analíticas de estos biosensores como la sensibilidad o la especificidad, se mejoran en gran medida debido a sus distintas propiedades físicas y químicas y sus excelentes propiedades ópticas, eléctricas, catalíticas y magnéticas. Por ejemplo, empleando nanomateriales como sistemas de amplificación de señal o elementos generadores de señales simples [12].
 - b) Nanosistemas de imagen: Mediante el uso de nanomateriales se desarrollan nuevos sistemas de imagen, que proporcionan un mejor contraste y una biodistribución controlada debido a sus propiedades ópticas, químicas y físicas únicas que presentan estos materiales. En la terapia frente al cáncer la acumulación de las nanopartículas en los tumores ha permitido el diagnóstico de lesiones de pequeño tamaño que no pueden ser detectadas por los agentes de imagen clásicos [13].

En algunos casos existe una combinación de ambas áreas (liberación de fármacos y diagnóstico), esta rama es conocida como Teranóstica. Su finalidad es diseñar

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

y aplicar nanomateriales que localicen una patología (diagnóstico) y que, a su vez, transporten y liberen fármacos simultáneamente y de manera controlada (terapia) [14–16].

3. Medicina Regenerativa. Se centra en la aplicación de nanoestructuras para construir sistemas que en combinación con la Biología Celular, se puedan usar en el campo de la Medicina Regenerativa para reparar o reemplazar tejidos u órganos dañados [10, 17].

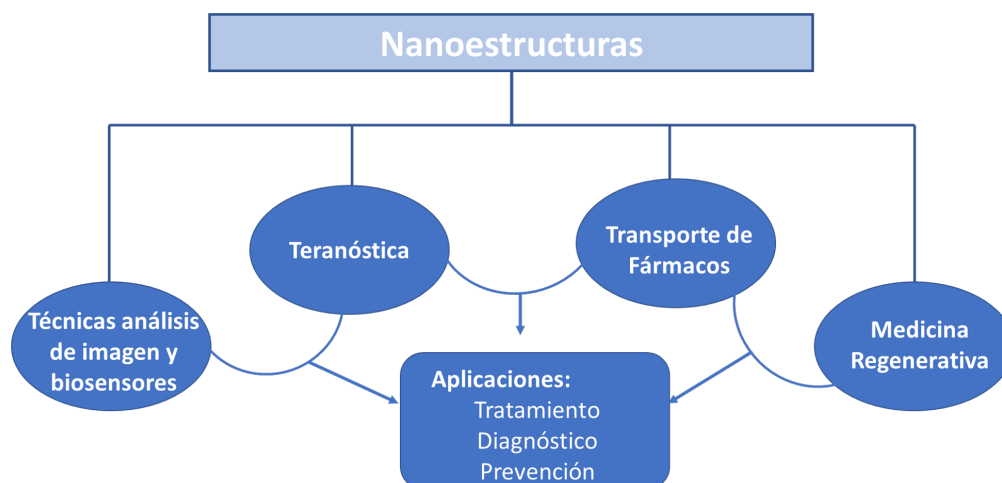


Figura 1.2: Aplicaciones de la Nanomedicina.

1.2. Liberación de fármacos. Tipos de nanosistemas

El uso más destacado de la Nanotecnología en el área médica es el desarrollo de sistemas novedosos de administración de fármacos [18, 19]. La Nanomedicina se ha propuesto como una posible solución para el desarrollo de nuevos sistemas de liberación controlada de fármacos, empleando nanoestructuras que transporten específicamente el fármaco hasta su diana farmacológica. Para ello, es necesaria la previa encapsulación de los fármacos en el nanotransportador para que no actúen hasta llegar al lugar afectado, de forma que mantengan intactas sus propiedades físico-químicas, minimizando así posibles efectos secundarios en otras zonas del organismo. Una vez que el fármaco ha llegado a su destino, éste debe liberarse a una velocidad apropiada para que sea efectivo. Esta liberación puede controlarse mediante estímulos, como una variación de ciertas condiciones (pH o temperatura, p. ej.) [20] o mediante un control preciso de la velocidad de degradación del material que forma el nanotransportador, permitiendo que la liberación del fármaco sea controlada. Para la administración de fármacos se ha propuesto una gran variedad de nanoestructuras. Los materiales y las tecnologías que se han utilizado para la construcción de estos nanosistemas de liberación de fármacos son muy diversos, pero se pueden clasificar de manera muy general según su naturaleza química en tres grupos (Fig. 1.3) [21]:

1. Nanoestructuras orgánicas. En este grupo se encuentran los materiales poliméricos y los nanosistemas basados en lípidos con los que se construyen nanoesferas, nanocápsulas, micelas, liposomas, dendrímeros y conjugados polímero-fármaco, entre otros.

2. Nanoestructuras inorgánicas. Bajo esta clasificación algunos ejemplos son las nanopartículas de óxidos metálicos, metales nobles, semiconductores o las nanopartículas de sílice mesoporosa.
3. Nanoestructuras basadas en carbono. En esta categoría se incluyen los fullerenos, nanotubos, grafeno y carbon dots. Las nanopartículas a base de carbono se consideran de interés en aplicaciones biomédicas debido a sus propiedades físicas, incluyendo alta conductividad eléctrica y excelente resistencia mecánica.

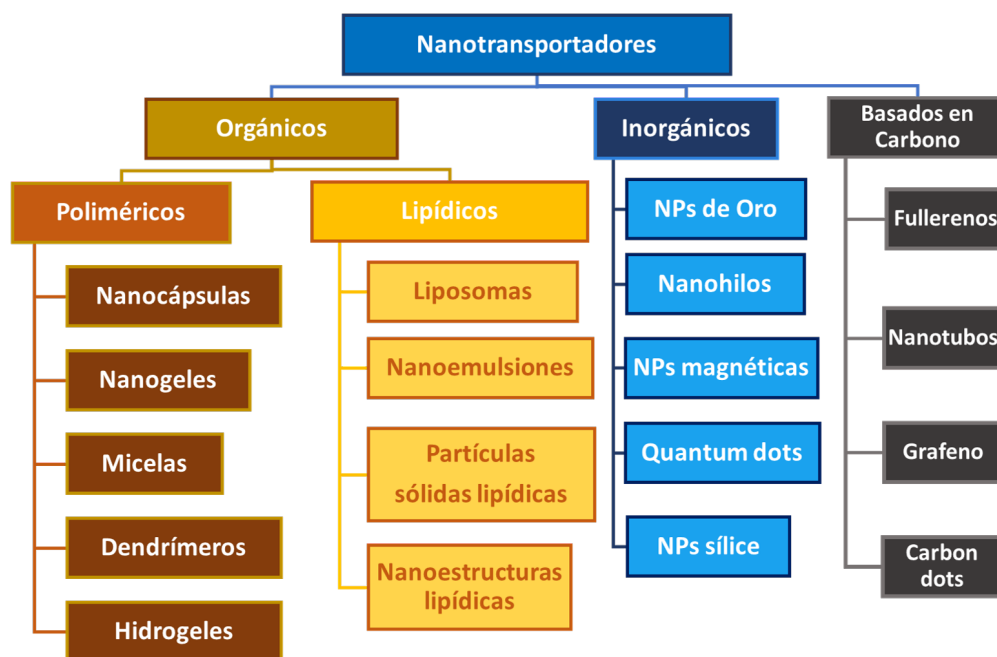


Figura 1.3: Clasificación de los nanotransportadores atendiendo a su naturaleza.

Entre sus ventajas, la Nanotecnología permite que la liberación del fármaco sea mínimamente invasiva, ya que estos nanosistemas pueden atravesar tejidos y membranas celulares. Se ha demostrado que la tasa de entrada de nanoestructuras en las células es mucho más alta que la entrada de partículas con tamaños mayores, entre 1 y 10 μm [22, 23]. Por lo tanto, este tamaño permite la interacción directa con las células con mayor eficiencia y produciendo menos efectos adversos. Aunque no solo el tamaño es relevante en la interacción de los nanomateriales con las células, otros aspectos como la morfología, la carga superficial o la funcionalización son factores que influyen en esta interacción [4, 22]. Otra gran ventaja es que la efectividad del medicamento se ve incrementada mediante el control preciso de la dosis requerida. Recientemente, se han producido avances enormes en el campo de los sistemas de administración de fármacos y son muchos los fármacos que se encuentran disponibles en el mercado basados en la Nanotecnología [24, 25].

Otro aspecto importante de los sistemas de administración de fármacos es el tipo de transporte o vehiculización del fármaco empleado en estos nanosistemas. Este transporte puede clasificarse en transporte pasivo y activo:

1. El transporte pasivo consiste en que el nanosistema circule a través del torrente sanguíneo y sea conducido al sitio de acción por afinidad o unión condicionada por

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

propiedades como pH, temperatura, morfología del nanosistema o carga superficial del mismo.

2. El transporte activo, por el contrario, implica el acoplamiento en la superficie del nanotransportador de moléculas específicas como anticuerpos o péptidos que van a permitir un reconocimiento y unión específica a receptores expresados en el lugar de acción del fármaco. Tales receptores suelen ser receptores de membrana, antígenos o proteínas superficiales [26].

La Nanotecnología ha abierto nuevos horizontes en la administración de fármacos en el campo de la Nanomedicina. Ofrece una alternativa para entregar un amplio espectro de agentes, desde fármacos de pequeño peso molecular hasta macromoléculas como proteínas, péptidos, o incluso material genético, para fines localizados o sistémicos. En la Figura 1.4 se indica la amplia versatilidad que puede presentar el diseño y posterior desarrollo de los nanotransportadores de fármacos.



Figura 1.4: Propiedades en el diseño de los nanotransportadores de fármacos.

En los últimos años se han desarrollado nanoestructuras para la administración dirigida de fármacos con los objetivos de mejorar la biodisponibilidad de fármacos orales, solubilizar fármacos destinados a la administración intravenosa, y/o para mejorar la estabilidad de los fármacos frente a procesos químicos como la degradación enzimática, especialmente en el caso de moléculas más sensibles a estos procesos como son proteínas, péptidos y ácidos nucleicos [27].

Los nanotransportadores pueden penetrar los tejidos a través de las paredes capilares y fenestraciones cruzadas en los revestimientos epiteliales (p. ej. hígado o bazo), y generalmente son internalizados por las células, según se ha observado en ensayos *in vitro* [28]. Sin embargo, todavía existen ciertos desafíos que necesitan ser solventados. Los fármacos con muy baja solubilidad presentan problemas de biodisponibilidad cuando son ingeridos por vía oral o necesitan ser administrados a una alta dosis por vía intravenosa, generando múltiples efectos adversos en el paciente. Algunas de estas limitaciones podrían superarse empleando nanotransportadores de fármacos. A día de hoy, son muchos los estudios realizados en el transporte de fármacos a nanoescala debido a sus ventajas, como la posibilidad de modificar y adecuar propiedades como la solubilidad, controlar el perfil de

liberación y mejorar la biodisponibilidad e inmunogenicidad. Esto, en consecuencia, puede conducir al desarrollo de nuevas vías de administración más adecuadas por presentar menos toxicidad, menos efectos secundarios y, en términos generales, que el perfil farmacocinético del fármaco se vea mejorado [29]. Según el punto de vista de la farmacoterapia, los problemas de seguridad y eficacia que generan muchos fármacos en el momento de ser administrados se debe a que presentan un perfil farmacocinético inadecuado. Si se atiende a la base de la farmacoterapia, esta consta de dos fases: una fase farmacocinética en la que se administra la dosis del fármaco para lograr una concentración determinada en tejidos, así como en la diana farmacológica, y una fase farmacodinámica en la cual la concentración de fármaco se traduce en un efecto del mismo (Fig. 1.5).

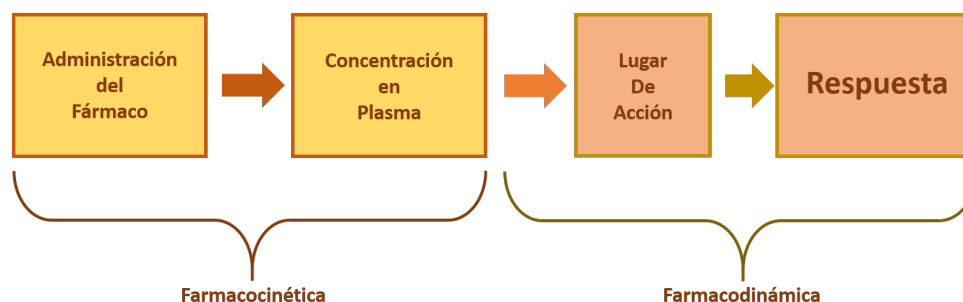


Figura 1.5: Relación entre Farmacocinética y Farmacodinámica.

A medida que aumenta la concentración del fármaco en el sitio del receptor, la respuesta farmacológica también aumenta, por lo tanto, el desarrollo de sistemas de transporte capaces de dirigir los fármacos de forma selectiva al sitio o sitios de acción dentro del organismo se ha convertido en el objetivo final de la investigación sobre administración de fármacos en todo el mundo. El ejemplo más común de consideraciones de eficacia y seguridad, está en el campo de la quimioterapia. Los nuevos métodos de selección de fármacos contra el cáncer han intentado alcanzar un equilibrio entre los efectos antineoplásicos y los efectos citotóxicos nocivos. En este contexto, una amplia gama de fármacos han sido estudiados para ser transportados y alcanzar específicamente el lugar de acción manteniendo un rango de concentración controlado en el tiempo [30–32]. Por otro lado, la capacidad de mantener una concentración de fármaco dentro de la ventana terapéutica con fluctuaciones mínimas mediante el empleo de sistemas sostenidos de administración de fármacos, es otro requisito clave para el éxito. La búsqueda de protocolos de tratamiento farmacológico en un tiempo controlado, modificando el perfil farmacocinético del fármaco, es la meta a alcanzar para lograr el perfil de efecto deseado de un tratamiento. Debido a que las sustancias activas son muy variables en sus propiedades fisicoquímicas, así como sus aplicaciones terapéuticas, muchos sistemas de administración de fármacos nuevos se han desarrollado con el objetivo de lograr una mejora en las características del fármaco de interés.

Como se ha explicado anteriormente, los nanosistemas transportadores de fármacos poseen un enorme potencial como sistemas de transporte con fines terapéuticos y/o de diagnóstico y son muy prometedores para el desarrollo de futuros regímenes terapéuticos. Sin embargo, un análisis cuantitativo sistemático y completo del perfil farmacocinético (es decir, de la absorción, distribución, metabolismo y excreción, proceso ADME) de las nanoestructuras empleadas en el transporte de fármacos puede conducir a ciertas ventajas para su futura aplicación clínica. Estas ventajas son:

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1. Una mejor comprensión del perfil farmacocinético básico del fármaco de estudio, particularmente en la población de pacientes de interés.
2. Un diseño lo más cercano posible a la realidad de los nanosistemas adaptados para aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico específicas.
3. Una mejor comprensión de las posibles interacciones específicas y no específicas entre nanoestructuras-tejidos y nanoestructuras-células.
4. Evaluaciones de las posibles formas de modular los parámetros de ADME para optimizar los perfiles de seguridad y eficacia del fármaco y predecir así, las posibles investigaciones futuras.

De hecho, la farmacocinética proporciona una descripción cuantitativa de las condiciones *in vivo* bajo las cuales una dosis de fármaco causa cualquier efecto terapéutico o tóxico observado a través de las concentraciones del mismo. La base de los estudios farmacocinéticos son las curvas de concentración de fármaco-tiempo, que, a su vez, sirven como puntos iniciales para estimar los parámetros farmacocinéticos con los modelos matemáticos adecuados. Estos parámetros se utilizan para relacionar cuantitativamente el efecto del fármaco a las concentraciones biológicas correspondientes. En este contexto, las nanopartículas tienen potencial como “modificadores farmacocinéticos de fármacos” para lograr objetivos de administración de fármacos predefinidos temporalmente. Por lo tanto, el perfil farmacocinético del fármaco original asociado con las nanoestructuras desarrolladas es una herramienta para evaluar nuevos sistemas mejorados [33].

Para optimizar las propiedades de administración de fármacos de los nanotransportadores se realizan una serie de pruebas de caracterización en los nanovehículos desarrollados, principalmente un testeo con pruebas *in vitro* e *in vivo*. Las pruebas *in vitro* proporcionan colectivamente una medida indirecta de las propiedades de administración de fármacos de los nanosistemas propuestos a través de una serie de características: tamaño de partícula, morfología, composición química, carga superficial, polaridad, perfil de liberación del fármaco, etc. Las pruebas *in vivo*, por otro lado, se realizan posteriormente a las pruebas *in vitro* para evaluar su funcionamiento directamente en tejidos de un organismo vivo. Normalmente, los tipos de pruebas *in vitro* que se realizan en los nanotransportadores desarrollados son: pruebas farmacodinámicas (pruebas relacionadas con los efectos farmacológicos) y pruebas farmacocinéticas de la partícula y/o el fármaco asociado con la partícula. En los ensayos *in vivo*, estos nanosistemas están expuestos a diferentes entornos y condiciones de estrés que colectivamente determinan el destino biológico tanto de la nanoestructura como de los fármacos vehiculizados. Para abordar este problema, gran parte de la investigación actual se centra en el testeo de los nanosistemas transportadores de fármacos en cultivos celulares. Aunque los estudios basados en dichos cultivos tienen ventajas, los datos y los resultados de estos estudios no son concluyentes y requieren ser complementados por ensayos en modelos animales específicos. Por otro lado, estos sistemas *in vivo*, empleando modelos animales, a veces son extremadamente complicados porque las interacciones de nanoestructuras con componentes biológicos conducen a resultados complejos de analizar [34].

Los avances en el diseño de nanoestructuras han llevado a la introducción de muchos tipos de sistemas de administración de fármacos nanoparticulados, muchos de los cuales se

encuentran actualmente en diferentes etapas de investigación. Estas partículas, fabricadas con diversos materiales tienen arquitecturas diferentes, a veces únicas, que los hacen adecuados transportadores para objetivos terapéuticos específicos. En el escenario actual de la nanotecnología médica, hay disponibles una variedad de productos basados en esta tecnología [25,35–38] que se aplican en la práctica clínica. Algunos de estos productos están recogidos en las tablas que se muestran a continuación (Tabla 1.1 y Tabla 1.2). Notablemente, tales formulaciones han sido principalmente desarrolladas para medicamentos que tienen baja solubilidad acuosa y alta toxicidad, y estas nanoformulaciones son a menudo capaces de reducir la toxicidad al tiempo que mejoran las propiedades farmacocinéticas del fármaco en cuestión. Según una revisión de Caster y cols. [39] aunque pocos medicamentos basados en Nanomedicina han sido regulados por la *Food and Drug Administration* (FDA) hay muchas iniciativas que están actualmente en progreso en términos de ensayos clínicos, que sugieren muchos nuevos medicamentos basados en Nanotecnología. Entre estos nanomateriales que están en fase de estudio, 18 están dirigidos a quimioterapia; 15 están destinados a agentes antimicrobianos; 28 son para diferentes aplicaciones médicas (entre las que están enfermedades psicológicas y enfermedades autoinmunes) y 30 están dirigidos a terapias basadas en ácidos nucleicos [39]. En el año 2019, otra revisión de Anselmo y cols. [25] mostró cómo en tres años tres nuevos productos han sido comercializados para su uso clínico.

Tras explicar la importancia que presenta conocer el perfil farmacocinético del fármaco y del nanotransportador elegido para alcanzar resultados exitosos, se debe considerar otro aspecto como es la elección del nanosistema. Como se ha dicho anteriormente son muchos los nanosistemas que existen para ser utilizados como nanotransportadores (Fig. 1.3), pero la selección de la nanopartícula se basa principalmente en las características fisicoquímicas del fármaco que se quiere vehiculizar [40], así como en las del tejido o célula diana a donde se quiere dirigir. En particular, los fármacos que tienen baja solubilidad con menor capacidad de absorción son las moléculas elegidas para ser vehiculizadas en nanosistemas [29,41].

1.3. Nanosistemas lipídicos

Muchos de los medicamentos diseñados con el fin de actuar frente a un problema clínico muestran una eficacia potencial en la etapa *in vitro*, pero la mayoría de ellos fallan en los ensayos *in vivo* debido a una falta de biodisponibilidad al lugar de acción, limitada principalmente por las características fisicoquímicas del fármaco y las barreras fisiológicas del organismo. Aspectos como el tamaño, la carga y la hidrofobicidad afectan principalmente a la permeabilidad y distribución del fármaco [42,43], y es que la mayoría de los fármacos presentan diferentes tipos de problemas, tales como pobre solubilidad acuosa, baja biodisponibilidad *in vivo* o semivida plasmática corta [44]. Muchos fármacos no tienen un equilibrio justo entre absorción y biodisponibilidad, que está alterado por la naturaleza hidrofílica o hidrofóbica, por lo que son necesarios nuevas alternativas. Diversos estudios [45–47] han indicado que, aproximadamente, el 40 % de las sustancias desarrolladas por la industria farmacéutica que presentan buenas características para unirse a su diana farmacológica presentan baja solubilidad acuosa, por lo que necesitan de un nanosistema que mejore este inconveniente a través de la liberación controlada [48,49] y localizada de medicamentos [50].

Tabla 1.1: Medicamentos basados en Nanotecnología aprobados por la FDA [24].

Nombre Comercial	Sustancia Activa	Nanosistema	Aplicación	Ventajas
Onivyde® (Merrimack)	Irinotecán	Liposomas	Cáncer de páncreas	Incremento de acción en el tumor (especificidad), disminución de la toxicidad
Adagen® (Sigma-Tau Pharmaceuticals)	Pegademasa bovina	Enzima adenosina desaminasa pegilada	Immunodeficiencia	Mejora el tiempo de circulación en el cuerpo y disminuye la inmunogenicidad
Oncaspar® (Enzon Pharmaceuticals)	l-Asparaginasa	l-asparaginasa pegilada	Leucemia linfoblástica aguda	Mayor estabilidad de las proteínas (Pegilación)
DepoCyt® (Sigma-Tau)	Citarabina	Liposomas	Meningitis linfomatosa	Incremento de acción en el tumor (especificidad), disminución de la toxicidad
Copaxone® (Teva)	Acetato de glatiramer	L-glutámico, l-alanina, l-lisina y copolímero aleatorio de l-tirosina	Esclerosis múltiple	Polímero a base de aminoácidos de gran tamaño con peso molecular controlado
Renagel® (Sanofi)	Hidrocloreuro de sevelamer carbonato de sevelamer	Hidrocloreuro de polialilamina	Enfermedades crónicas de riñón	Aumenta la especificidad al lugar de acción y aumento del tiempo de circulación en el organismo
PegIntron® (Merck)	Interferón-alfa (IFN- α 2b)	Proteína pegilada IFN- α 2b	Hepatitis C	Mejora la estabilidad de la proteína por pegilación
Pegasys® (Genentech)	Interferón-alfa (IFN- α 2a)	Proteína pegilada IFN- α 2a	Hepatitis B y C	Mejora la estabilidad de la proteína por pegilación

Tabla 1.2: Medicamentos basados en Nanotecnología aprobados por la FDA. (cont.) [24].

Nombre Comercial	Sustancia Activa	Nanosistema	Aplicación	Ventajas
Eligard® (Tolmar)	Acetato de leuprorrelina	Polímero (PLGH) ácido poli (DL-láctico-co-glicólico)	Cáncer de próstata	Liberación controlada y aumento del tiempo de circulación en el organismo
Neulasta® (Amgen)	Filgrastim pegilado	Factor estimulante de granulocitos (Proteína pegilada)	Neutropenia inducida por quimioterapia	Mejora la estabilidad de la proteína por pegilación
Somavert® (Pfizer)	Visomant pegilado	Antagonista receptor HGH pegilado	Acromegalia	Estabilidad de la proteína por estar pegilada
Macugen® (Bausch & Lomb)	Aptanib pegilado	Aptámero del factor de crecimiento antiendotelial vascular pegilado	Degeneración macular	Mejora de la estabilidad por pegilación
Mircera® (Hoffman-La Roche)	Metoxi polietilenglicol epoetina beta	Agente estimulante de eritropoyesis sintetizado químicamente	Anemia asociada a trastorno renal	Mejora de la estabilidad por pegilación
Cimzia® (UCB)	Certolizumab pegol	Fragmento de anticuerpo pegilado (Certolizumab)	Enfermedad de Crohn artritis reumatoide; artritis psoriásica y espondiloartritis anquilosante	Incremento de la estabilidad y de la circulación por el organismo
Krystexxa® (Horizon)	PEG-loticasa	Uricasa pegilada similar a la porcina	Gota crónica	Mejora de la estabilidad por pegilación
Plegridy® (Biogen)	Interferón-beta (IFN- β 1a)	IFN- β 1a (proteína pegilada)	Esclerosis múltiple	Mejora de la estabilidad por pegilación
ADYNOVATE® (Baxalta)	Factor VIII	Factor VIII pegilada	Hemofilia	Mejora de la estabilidad por pegilación

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

A día de hoy, es complejo desarrollar nuevos sistemas de administración para fármacos con baja solubilidad en agua, lo que limita la administración oral de medicamentos, que es la forma más empleada de administración al paciente. Por otro lado, la velocidad de disolución del fármaco depende de la solubilidad de éste en fluidos gastrointestinales y otro aspecto a tener en cuenta es que la hidrofobicidad de las moléculas afecta en la capacidad de penetrar en las células epiteliales intestinales [51]. Además, si la hidrofobicidad de una molécula es alta aumenta la eficiencia de unión a proteínas, lo que se traduce en un retraso en su eliminación y la metabolización [52,53].

Para cumplir con este propósito, las nanopartículas formuladas principalmente con materiales biodegradables como los lipídicos pueden ser una posible solución [54–56]. Dichos sistemas han demostrado un rendimiento prometedor cuando su composición se basa en lípidos. Transportar un fármaco en un sistema lipídico puede mejorar la solubilidad acuosa, dando como resultado una buena biodisponibilidad. Además, estos sistemas basados en lípidos también inhiben fenómenos como la oxidación, descomposición y degradación del fármaco mejorando el almacenamiento de estos [57]. La administración de medicamentos mediante nanosistemas con base lipídica es un área en constante crecimiento debido a que presentan unas propiedades fisicoquímicas óptimas, entre las que destacan la biocompatibilidad, baja susceptibilidad a los fenómenos de erosión y la lenta absorción de agua. De esta manera los lípidos se presentan como buenos candidatos como sistemas de transporte para mejorar características como la solubilidad acuosa, la biodisponibilidad y la eficacia terapéutica. Existen diferentes sistemas de administración de fármacos basados en lípidos (Fig. 1.6), entre ellos los más empleados son los liposomas [58], las partículas sólidas lipídicas (*solid lipid particles* [SLPs]) [59], los transportadores lipídicos nanoestructurados (*nanostructured lipid carriers* [NLCs]) [60] y las nanoemulsiones [61].

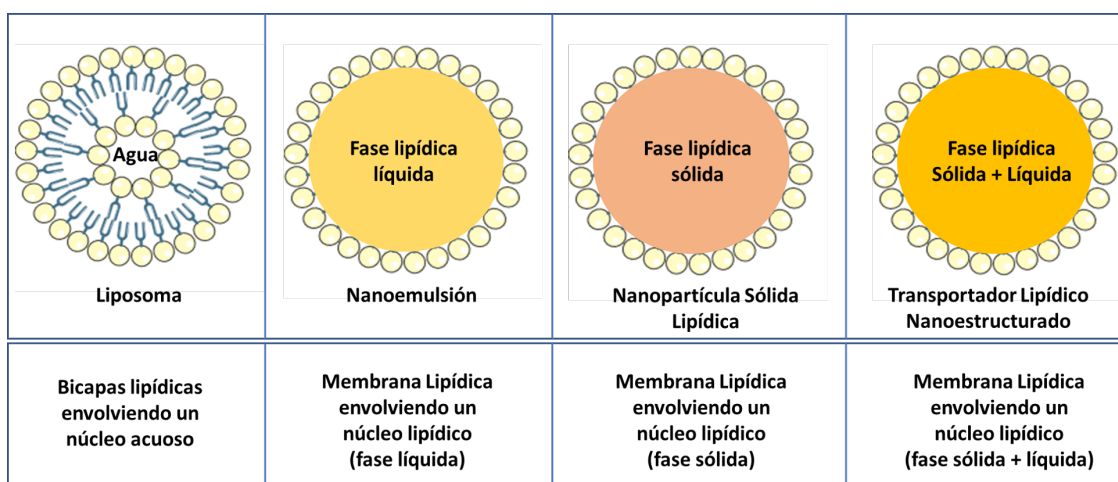


Figura 1.6: Clasificación de los tipos de nanosistemas lipídicos más empleados.

La investigación en el área de las nanopartículas con base lipídica comenzó a principios de la década de 1960 con la introducción de emulsiones parenterales, que ayudaron en la administración de muchos fármacos hidrosolubles y lipofílicos. Estas emulsiones parenterales tuvieron gran importancia ya que el método ofrecía las ventajas de ser llevado a gran escala. Sin embargo, se asociaron algunos problemas graves con estas emulsiones, como la separación del fármaco de la fase lipídica a la fase acuosa

o la baja estabilidad de almacenamiento. Se presentaron problemas de aglomeración o separación de fases en casi todos los estudios, pero sí se logró un perfil de liberación sostenida en el tiempo en el caso de los fármacos de naturaleza lipófila, cuando eran vehiculizados en nanotransportadores [62]. Para resolver los problemas asociados con las emulsiones parenterales se introdujeron posteriormente otros nanosistemas, las nanopartículas poliméricas. Las nanopartículas a base de polímeros presentan ventajas en términos de su biocompatibilidad y biodegradabilidad. Los polímeros se utilizan para aportar diversas características funcionales a las nanopartículas, aunque estos nanosistemas también presentan ciertos inconvenientes como la toxicidad, tiempo de residencia prolongado, disolventes orgánicos residuales, e inconvenientes a la hora de trasladar el proceso de producción a gran escala. Los liposomas se desarrollaron como alternativa para superar los inconvenientes antes citados, eran biocompatibles y biodegradables, además de presentarse como uno de los nanotransportadores más prometedores en la entrega y liberación de fármacos. De hecho fueron los primeros en aprobarse para su comercialización y uso clínico. Sin embargo, con el tiempo diversos estudios mostraron inconvenientes como baja estabilidad, inespecificidad en muchos casos o captación rápida por macrófagos al ser administrados por vía parenteral [62]. Los últimos nanosistemas con base lipídica empleados fueron descubiertos a principios de la década de 1990, cuando comenzaron a desarrollarse nanopartículas basadas en matrices lipídicas sólidas a temperatura ambiente [60].

Las SLPs y más tarde los NLCs han sido uno de los nanosistemas que más se han estudiado en estos últimos años debido a que presentan características muy prometedoras en el campo de la liberación y vehiculización de fármacos [63]. Las SLPs se han empleado como nanotransportadores eficaces de diferentes fármacos, pero su uso en ocasiones es limitado, debido a dificultades en aspectos de formulación, estructura o procesos de cristalización durante su almacenamiento [64]. Como solución a estos problemas se ha desarrollado una segunda generación de estos nanotransportadores lipídicos, los transportadores lipídicos nanoestructurados que superaron los problemas asociados con los SLPs debido a la presencia de lípidos en estado líquido junto a lípidos sólidos en una proporción óptima (Fig.1.6) [65]. Los principales componentes de estos nanosistemas son lípidos (sólidos y líquidos), agua y emulsionantes. Estos nanosistemas lipídicos presentan baja toxicidad y son muy versátiles en cuanto al fármaco a encapsular se refiere, ambos nanosistemas permiten encapsular fármacos, tanto hidrófobos como hidrófilos. Pueden aumentar eficazmente la estabilidad del fármaco al ir encapsulado y se puede mejorar la vida útil de la forma farmacéutica empleada. Varios estudios han mostrado que son eficaces para administración tópica (dérmica y transdérmica) [63, 66, 67], pero también han presentado inconvenientes como por ejemplo una cierta citotoxicidad por la composición de la matriz o por efectos irritantes y sensibilizantes de algunos tensioactivos, a falta aún de más estudios preclínicos y clínicos de estos nanosistemas.

1.4. Partículas sólidas lipídicas

De entre los nanosistemas basados en lípidos que se han explicado previamente se encuentran las partículas sólidas lipídicas [27, 68]. Este sistema de administración de fármacos presenta ventajas frente a otros nanosistemas, como las nanopartículas poliméricas o las nanoemulsiones. Las SLPs son partículas coloidales con un tamaño que

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

puede variar entre 50 nm y 1 μm . El diseño de este sistema está basado en una matriz de lípidos inertes que permite limitar la movilidad del fármaco, proporcionándole mayor estabilidad. Su composición se basa en el empleo de lípidos sólidos (lípidos que son sólidos a temperatura ambiente) y estabilizados con tensioactivos, con polímeros o mezclas de ambos. Los tensioactivos o surfactantes son compuestos que permiten generar y estabilizar emulsiones, ya que actúan en la superficie de dos fases inmiscibles. Son capaces de albergar tanto fármacos de naturaleza hidrófoba como hidrófila. Las SLPs se han convertido en un sistema de transporte de fármacos prometedor [62, 69] por su sencillez, versatilidad y biocompatibilidad, atrayendo una enorme atención de la comunidad científica en los últimos años. Cuanto menor es el tamaño de la partícula, más probable es que permanezcan estables, y más aumenta su especificidad de respuesta [65, 70]. Son una nueva generación de emulsiones a base de lípidos donde el lípido líquido (aceite), propio de las nanoemulsiones, ha sido reemplazado por un lípido sólido (Fig. 1.6). Poseen propiedades únicas como pequeño tamaño y alta capacidad de carga de fármacos. Han demostrado ser una alternativa de gran importancia en mejorar la eficacia terapéutica de medicamentos y productos alimenticios entre otros [71]. Al ser similares a las nanopartículas poliméricas, su matriz sólida proporciona protección de los compuestos activos cargados en ellas frente a fenómenos como la degradación química bajo un ambiente biológico severo. Su diseño también influye en la liberación del compuesto, modificando el perfil de liberación del mismo. Además, pueden sintetizarse a escala industrial mediante técnicas como la homogeneización a alta presión. Todas estas características hacen a las SLPs excelentes transportadores de fármacos [69].

1.4.1. Composición de las partículas sólidas lipídicas

Estructuralmente, las SLPs se componen de lípidos sólidos, tensioactivos, co-tensioactivos (si son necesarios) y fármacos. Todos los lípidos utilizados en la producción de SLPs son biodegradables y biocompatibles y tienen una amplia diversidad estructural. Los más empleados se muestran en la Tabla 1.3. Los lípidos utilizados en la producción se clasifican en alcoholes grasos, ácidos grasos, ésteres grasos, glicéridos parciales o triglicéridos. Algunos estudios hablan también del empleo de ceras como componente lipídico de estos nanosistemas [72]. Las SLPs se forman gracias al empleo de sustancias como tensioactivos, mejorando la estabilidad del sistema coloidal. Cuando el material lipídico se estructura como partícula (núcleo lipídico sólido rodeado de moléculas de tensioactivo), el resultado muestra propiedades alteradas. Estas propiedades se deben a (i) los cambios involucrados en el estado físico de las moléculas del lípido; (ii) el nivel de interacción molecular dentro del núcleo lipídico y con el entorno de tensioactivo acuoso; (iii) las energías involucradas, ya que al disminuir el tamaño de partícula por debajo de un rango submicrométrico, se produce un aumento relativo del área de la superficie, lo que se traduce en una mayor interacción entre las moléculas de lípido/tensioactivo/fármaco y; (iv) la concentración de partículas. La estructura interna es otro parámetro importante que cambia drásticamente al disminuir el tamaño de partícula [73, 74], ya que las SLPs se componen de lípidos puros o mezclas de mono-, di- y triacilgliceroles, su estructura interna será muy diferente en comparación con el material a escala de tamaño mayor.

Tabla 1.3: *Compuestos más utilizados en la síntesis de partículas sólidas lipídicas (SLPs) [75].*

Compuestos	Tipos	Ejemplos
Lípidos	Ácidos grasos	Witepsol (W35; H35; H42; E85) y ácidos (estearico, palmítico, decanoico, behenico)
	Ceras	Palmitato de cetilo; Alcohol cetílico; Cera de Carnauba; Cera de abeja; Cera emulsificante NF; Colesterol
	Triglicéridos	Tricaprina; Trilaurina; Trimiristina; Tripalmitina; Triestearina; Tribehenina; Dinasan 112®;
	Diglicéridos	Palmito estearato de glicerol; Dibehenato de glicerol; Diestearato de glicerol (Precirol ATO 5®)
	Monoglicéridos	Monoestearato de glicerol (Imwitor 900®); Behenato de glicerol (Compritol 888 ATO®)
	Surfactantes iónicos	Colato sódico; Glicocolato sódico; Taurodeoxicolato
Emulsificantes/ Co-emulsificantes	Surfactantes anfotéricos	Fosfatidilcolinas (Lipoid E, PC, S, S 100, S PC, E PC-3, S PC-3, 80 H, 90 H, E 80 S, S 75; Epikuron®170, 200)
	Surfactantes no iónicos	Poloxamer (188, 182, 407, 908); Tiloxapol; Polisorbato (20, 60, 80); Span®(20 y 80); Brij®78
	Co-emulsificantes	Butanol, ácido butírico, etanol, etc.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

En el proceso de síntesis de las partículas, el lípido debe fundirse o solubilizarse en un disolvente orgánico o en el propio lípido fundido, y tras un proceso de enfriamiento o eliminación de disolvente, el lípido se solidifica de nuevo. Generalmente, la solidificación de las moléculas de lípidos derretidas crea una inestabilidad propia de la transición de fase [76, 77]. La transición de fase es un proceso por el cual, en función de la temperatura, los lípidos pasan de estado gel, con las cadenas hidrocarbonadas más rígidas a estado cristal líquido, más fluido, con las cadenas hidrocarbonadas más móviles. La temperatura a la cual se produce el paso de un estado a otro es la temperatura de transición de fase (TC). El tamaño de partícula es el factor principal que afecta a esta tasa de transición de fase, que es mucho más rápida en partículas de lípidos coloidales que en el lípido a mayor escala. Además, las transiciones son más frecuentes cuando se utilizan lípidos con menores puntos de fusión. El polimorfismo en los lípidos también es un factor vital que afecta en gran medida las propiedades del sistema de nanopartículas a base de lípidos. Para los lípidos sólidos, la aparición de múltiples formas cristalinas se consideran particularmente importantes ya que proporcionan estructuras en las que pueden quedar atrapadas moléculas de fármacos. La tendencia de los lípidos sólidos a formar estructuras cristalinas o la velocidad a la que las transiciones de formas menos estables a otras más estables tiene lugar es otro factor crucial que influye en la selección de un lípido. Hasta ahora no se dispone de pautas perfectas para la selección de lípidos sobre estas propiedades.

Por otro lado, los parámetros de eficiencia de encapsulación (EE) o *entrapment efficiency* (EE) que se define como la cantidad del compuesto cargado en la partícula, respecto a la concentración inicial utilizada y la capacidad de carga o *drug loading* (DL). Esta última se define como la cantidad de compuesto cargado por cada 100 gramos de partículas [78]. Los puntos mencionados anteriormente como el nivel de interacción molecular dentro del núcleo lipídico y con el entorno de tensioactivo acuoso y las energías involucradas son intrínsecamente dependientes de estas tasas de transición. Al disminuir el tamaño de partícula por debajo de un rango submicrométrico, se producirá un aumento relativo del área de la superficie, lo que se traduce en una mayor interacción entre las moléculas de lípido/tensioactivo/fármaco explicados previamente. Los cambios en la estructura física de la matriz lipídica también influyen tanto en el tamaño de las partículas como en su morfología. Las partículas más grandes (>200 nm) suelen tener formas más esféricas, mientras que las partículas más pequeñas (<100 nm) se caracterizan por un bloque con una forma dispuesta en capas [73]. La longitud de las cadenas lipídicas también influye, ya que según sea esta longitud, las temperaturas de fusión y solidificación de las dispersiones de SLPs son muy diferentes de los materiales de un tamaño mayor [76].

1.4.2. Encapsulación de fármacos en las partículas sólidas lipídicas

Los parámetros de encapsulación altos son obviamente deseables, ya que reducen el número de partículas necesarias para alcanzar niveles terapéuticos. Dependiendo de su lipofilicidad e hidrofiliicidad, los fármacos se ubicarán en las partículas lipídicas de diferentes maneras. Para lograr unas eficiencias de encapsulación y capacidades de carga altas para un fármaco en particular, el requisito principal es una alta solubilidad en el lípido derretido [70]. Por tanto, las moléculas hidrófilas apenas se incorporan debido a su baja afinidad con la matriz lipídica. Para mejorar la solubilidad en el lípido derretido se pueden añadir solubilizantes. Ejemplos de estos son los tensioactivos no iónicos como polisorbatos

y polioxilos, que cubren un rango del balance hidrofílico-lipofílico (HLB) entre 1 y 18 y que se puede utilizar en combinación con lípidos para promover la autoemulsificación. El balance HLB de un tensioactivo es el grado en que este es lipófilo o hidrófilo según el estudio de su estructura. Según la escala arbitraria definida por Griffin en 1949, se considera un tensioactivo lipófilo con valores de 1-8 e hidrófilo cuando los valores son de 9-18. Además, cuando se utilizan mono y di-acilgliceroles como composición de matriz lipídica, la solubilidad del fármaco podría aumentar en comparación con lípidos de naturaleza más pura, como los triglicéridos. Los aceites y grasas naturales empleadas comprenden mezclas de mono-, di- y tri-acilgliceroles, que contienen ácidos grasos con longitudes de cadena y grado de insaturación variable. [79].

En cuanto al diseño y estructura de los sistemas, la estructura básica está compuesta por un núcleo sólido cubierto por una capa de moléculas de surfactante. Dependiendo del método de síntesis empleado, la encapsulación del fármaco puede producirse de tres formas diferentes (Fig. 1.7) [80]:

1. Las SLPs Tipo I se definen como modelo de cubierta enriquecida con fármaco, se obtiene cuando la concentración del fármaco en el lípido fundido es baja y durante el posterior enfriamiento de la nanoemulsión la fase lipídica precipita primero, formándose un núcleo de lípidos sin fármaco (o con baja concentración del mismo) [81]. Cuando el fármaco alcanza su solubilidad de saturación en la masa fundida restante, una capa exterior que contiene gran cantidad de fármaco se solidificará alrededor de este núcleo con baja cantidad de fármaco. Este modelo no es adecuado para una liberación prolongada de fármaco; sin embargo, se puede utilizar para obtener una liberación rápida del mismo, además de las propiedades oclusivas del núcleo lipídico.
2. Las SLPs Tipo II o modelo de núcleo enriquecido con fármaco [82, 83], se forma cuando la concentración de fármaco está relativamente cerca a la solubilidad de saturación en el lípido fundido. Al enfriar la nanoemulsión, la solubilidad del fármaco va a disminuir, precipitando y siendo cubierto por una capa de lípido casi libre de fármaco. Este tipo de encapsulación es útil para lograr una liberación prolongada de fármaco, ya que está inmovilizado dentro del núcleo lipídico.
3. Las SLPs Tipo III o modelo de matriz homogénea, se conocen así porque el fármaco está dispersado en el núcleo lipídico o en forma de racimos amorfos [59, 65, 84]. Este modelo se obtiene cuando las nanopartículas se sintetizan por técnicas de homogeneización a altas presiones. Como consecuencia de su estructura, las SLPs Tipo III pueden mostrar un perfil de liberación controlado en el tiempo.

El conseguir uno u otro tipo de encapsulación depende de los componentes de la formulación, es decir, de los lípidos empleados, el fármaco a encapsular, el tensioactivo utilizado, así como de las condiciones empleadas durante los métodos de producción, por ejemplo, la temperatura, la homogeneización o la velocidad de enfriamiento.

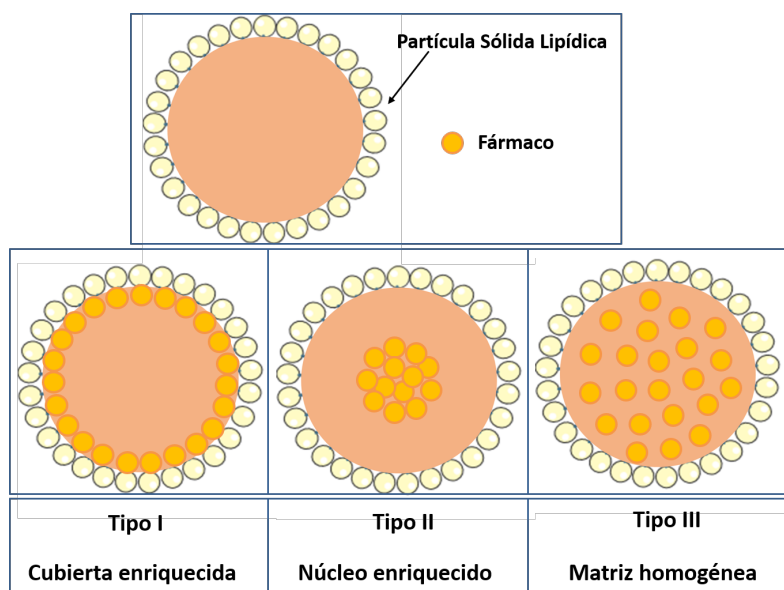


Figura 1.7: Tipos de encapsulación de fármaco en las partículas sólidas lipídicas.

1.4.3. Técnicas de síntesis de las partículas sólidas lipídicas

Las SLPs se preparan a partir de lípidos sólidos y tensioactivos empleando agua como disolvente por diferentes métodos. Existe una amplia variedad de técnicas, pero la selección del método depende de varios factores como:

1. Las propiedades fisicoquímicas del fármaco a incorporar.
2. La estabilidad del fármaco a incorporar en función de la temperatura.
3. Las características que se quieran obtener en la suspensión de partículas generada.
4. La estabilidad de la dispersión de partículas lipídicas.
5. La disponibilidad de los equipos de producción.

En las Tablas 1.4 y 1.5 se muestran las diferentes técnicas de síntesis de SLPs junto a las ventajas y desventajas que presenta cada método.

1.4.4. Caracterización de las partículas sólidas lipídicas

Las SLPs son el sistema de administración de fármacos de tamaño coloidal que presentan mayor complejidad, por lo que se requiere una caracterización adecuada y completa para un control de calidad y una formulación estable. Algunos de los parámetros importantes que deben evaluarse para las SLPs son el tamaño de partícula y distribución de tamaño, potencial zeta (carga superficial de la partículas), distribución del fármaco, grado de cristalinidad, modificación lipídica (polimorfismo) y morfología superficial.

Tabla 1.4: Técnicas de síntesis de partículas sólidas lipídicas [85].

Técnica	Ventajas	Desventajas
Homogeneización a altas presiones (HAP) I. Calor (*) II. Frío (**)	Buena reproducibilidad Sin empleo de disolventes orgánicos Posibilidad de producción a gran escala, si el fármaco es termolábil puede emplearse el método en frío	Proceso que requiere altas temperaturas y mucha energía, se requiere un equipo complejo, posible degradación del fármaco por calor
Homogeneización por ultrasonidos	No se requiere un equipo complejo, no es necesario el empleo de altas concentraciones de tensioactivos y co-tensioactivos	Posibilidad de contaminación por metales durante el empleo del equipo de ultrasonidos
Microemulsión	Rápido, reproducible y económico, requiere un bajo aporte de energía, posibilidad de producción a escala industrial, sin disolventes orgánicos	Es necesaria una concentración relativamente alta de tensioactivo, un alto contenido en agua difícil de eliminar posteriormente
Emulsificación por evaporación de disolventes	Apto para fármacos termolábiles, reduce el tamaño medio de la NP y una homogeneidad de tamaño	Se obtienen dispersiones de NPs muy diluidas, residuos de disolvente orgánico, es necesaria una ultrafiltración o evaporación
Emulsificación-Difusión	Los disolventes miscibles en agua se utilizan para disolver lípidos	Es necesaria una ultrafiltración o liofilización de la formulación final, pueden quedar residuos de los disolventes orgánicos
Inyección de solvente	Fácil de manejar, rápido y es un proceso reproducible, técnicamente sofisticado, no se requiere equipo	El uso de disolventes orgánicos

Tabla 1.5: Técnicas de síntesis de partículas sólidas lipídicas (cont.) [85].

Técnica	Ventajas	Desventajas
Inversión de fase	Los medicamentos termolábiles pueden ser incorporados mediante esta técnica, no se emplean disolventes orgánicos	Inestabilidad de la emulsión
Doble emulsión	Permite la incorporación de medicamentos hidrofílicos y no se requieren disolventes orgánicos	SLPs presentan un tamaño promedio demasiado grande
Emulsificación mediante membrana de contacto	Aparato simple de bajo costo, tamaño de partícula más pequeño y homogeneidad de tamaños	Obstrucción de la membrana

(*) I. Calor: Se considera una emulsificación y consiste en calentar la mezcla de lípido y fármaco a 5 °C-10 °C por encima del punto de fusión del lípido y adicionar la, mediante agitación mecánica a alta velocidad o empleando ultrasonidos, a una disolución acuosa de tensioactivo mantenida a la misma temperatura. La pre-emulsión obtenida se procesa en un homogeneizador a alta presión (300-500 bar) durante unos 3 a 5 ciclos, a temperatura controlada. Cuando la nanoemulsión se enfría a temperatura ambiente cristaliza en forma de SLPs.

(**) II. Frío: Se considera una molienda de una suspensión de partículas sólidas mediante la aplicación de alta presión y consiste en dispersar la mezcla de los componentes lipídicos en nitrógeno líquido o hielo seco. A continuación, se mezclan los componentes a gran velocidad hasta formar micropartículas. Posteriormente, se le añade una disolución acuosa fría de tensioactivo y se homogeneiza a temperatura ambiente (o inferior), generalmente a 500 bar durante 5 ciclos [86].

1.4.5. Características de las partículas sólidas lipídicas

Como se ha mencionado anteriormente el uso de sistemas de transporte de fármacos presenta diferentes ventajas con respecto a la administración convencional del fármaco. Algunas de las características más conocidas de estas partículas son las siguientes:

1. Una biodisponibilidad mejorada

La biodisponibilidad es un concepto farmacocinético que hace referencia a la fracción y la velocidad a la cual la dosis administrada de un fármaco alcanza su diana terapéutica, lo que implica llegar hasta el tejido sobre el que actúa. El aumento de la biodisponibilidad oral ha sido uno de los objetivos del empleo de estos nanosistemas para conseguir el mayor efecto de los fármacos encapsulados. La biodisponibilidad de muchos fármacos insolubles en agua o poco solubles mejoran cuando se incorporan en SLPs. Ejemplos de esta mejora se han producido en el estudio en el que se administraron dichas nanopartículas encapsulando piribedil. Este fármaco con eficacia en la terapia frente al Parkinson, pero con una biodisponibilidad reducida por su baja solubilidad en agua, se administró por vía oral a conejos. La biodisponibilidad aumentó el doble que la del piribedil convencional. Otro estudio se centró en la administración intraduodenal de idarrubicina en ratas y cuando se formuló en SLPs mostró una mejor biodisponibilidad en comparación con la solución de idarrubicina [87, 88].

2. Una liberación controlada

En general, es bien conocido que la liberación rápida de los fármacos de las formas farmacéuticas no suele considerarse beneficiosa, ya que las concentraciones elevadas de fármacos en plasma conducen a toxicidades y efectos secundarios no deseados. Al modificar la naturaleza química de la matriz lipídica, el perfil de liberación de los fármacos se puede modular. Esta característica permite que las formulaciones liberen el fármaco a un ritmo constante. Este efecto puede incrementarse haciendo las formulaciones de SLPs sensibles a estímulos como el pH o la temperatura. También se puede obtener mediante modificaciones superficiales de las SLPs con varios polímeros, permitiendo que las partículas permanezcan más tiempo en la circulación sistémica [87, 89].

3. Transporte pasivo

Para contextualizar este transporte pasivo, se sabe por diversos estudios desde hace más de una década, que cuando las partículas se administran por vía intravenosa, estas son rápidamente detectadas por el sistema retículo endotelial (RES, del inglés *reticuloendothelial system*). Más concretamente, los macrófagos las fagocitan, principalmente células de Kupffer del hígado (hasta un 90 % en 5 minutos) y macrófagos del bazo (2 % en 5 minutos) [90]. Este sistema es el encargado de fagocitar y eliminar partículas extrañas, microorganismos o toxinas del organismo, mediante un reconocimiento previo llamado opsonización. Cuando estas SLPs se administran por vía intravenosa (i.v.), las partículas coloidales interactúan con las proteínas del plasma sanguíneo, opsoninas, apolipoproteínas, etc. Esto conduce a la unión de las partículas a las membranas de los macrófagos, su posterior fagocitosis y eliminación del torrente sanguíneo [91]. Características como el tamaño de las partículas, su carga eléctrica superficial, y la hidrofobicidad afectan en gran medida a su

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

capacidad para evitar la opsonización y escapar de ser fagocitadas por los macrófagos.

Se han desarrollado diferentes estrategias para evitar este proceso, de modo que los macrófagos no reconozcan a las SLPs en la sangre. La técnica más empleada es el recubrimiento de las partículas con polímeros específicos hidrófilos y flexibles, aunque esto no es suficiente para evitar el reconocimiento por parte del RES. Según estudios previos acerca del recubrimiento de las partículas con polímeros de naturaleza hidrofílica, se observó que el espesor de dicha capa era la clave para evitar la captación de estas partículas [92]. Por lo que para alargar su tiempo de circulación deben estar recubiertos con una capa que tenga al menos 10 nm de grosor. De manera similar, cuando los SLPs se recubrieron con dos derivados lipídicos de monometil polietilenglicol 2000 (dipalmitoil fosfatidiletonolamina PEG 2000 (DPPE-PEG) y ácido esteárico PEG 2000) mejoró su estabilidad, porque las cadenas hidrofílicas de PEG forman una nube hidrofílica conformacional sobre los partículas que las protegen y afectan a su hidrofobicidad y a su carga. Cuando se estudió en macrófagos murinos y se determinó el grado de captación fagocítica por espectrofluorimetría, se mostró una disminución en la fagocitosis, ya que la concentración del polímero de recubrimiento que se emplea es fundamental. Para una baja adsorción de proteínas, la longitud de las cadenas y la densidad se consideran importantes. Las SLPs formuladas con tensioactivos de las series poloxámero y poloxamina mostraron acumulación en médula ósea y tiempos de circulación prolongados al reducir su captación por el RES [87].

4. Direccionamiento activo

El direccionamiento activo de nanosistemas consiste en emplear nanosistemas transportadores de fármacos que vehiculicen moléculas, como anticuerpos o péptidos, para que se unan como ligandos específicos a receptores presentes en los tejidos diana. La liberación de fármaco de un nanosistema mediante estímulos externos, como el empleo de ultrasonidos o un campo magnético también se le considera direccionamiento activo [93]. De entre las opciones de interacción de los transportadores de fármacos con las células diana pueden encontrarse:

- a) La interacción específica con receptores de membrana, facilitando su posterior captación por endocitosis mediada por receptores [94]. En algunos estudios se ha empleado el ácido fólico como compuesto de direccionamiento específico a células tumorales, ya que los receptores de folato se sobreexpresan en células de cánceres como el de mama, ovario, cerebro y pulmón. Por tanto, como los receptores de péptidos se encuentran sobreexpresados en células tumorales, los ligandos específicos de estos receptores se conjugan con el nanotransportador de fármacos, permitiendo que fármacos antineoplásicos se dirijan a un tumor específico.
- b) Componentes lipídicos de las membranas celulares. La interacción de análogos de fosfolípidos sintéticos con las membranas celulares provoca la alteración de la composición lipídica, la permeabilidad y la fluidez de la membrana. De esta forma, los mecanismos de transducción de señales se ven afectados, induciendo la muerte celular o apoptosis de la célula.
- c) Los antígenos o proteínas presentes en las superficies celulares. Las células dañadas expresan nuevas proteínas o exhiben una sobreexpresión o una ausencia de las proteínas que se encuentran en las células sanas. Por este motivo, se

utilizan anticuerpos monoclonales frente a estas proteínas. Algunos ejemplos de estos receptores expresados en células tumorales son el HER2, un factor de crecimiento sobreexpresado en el 20-30 % de los adenocarcinomas de mama, en la superficie de las células tumorales. La razón de su empleo en diversos estudios es su fácil accesibilidad, su baja expresión en células sanas y una distribución constante dentro del tumor.

Como posibles ligandos de direccionamiento se pueden emplear: azúcares, péptidos y anticuerpos diseñados para que interactúen específicamente con los receptores identificados en determinados tipos celulares [95, 96]. La existencia de lectinas endógenas en las células epiteliales de diferentes regiones intestinales se utiliza para la selección de fármacos mediante el empleo de carbohidratos [97]. La sobreexpresión de receptores externos en las células tumorales permite un direccionamiento específico utilizando, como ya se ha mencionado, ácido fólico como ligando [98–100]. Los péptidos del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), cuyo receptor se expresa en las células endoteliales de la neovasculatura en procesos metastásicos se utilizan para dirigir fármacos a sus receptores específicos expresados en diferentes estadios del cáncer [101, 102].

1.4.6. Aplicaciones de las partículas sólidas lipídicas

Diferentes SLPs pueden desarrollarse para el tratamiento de enfermedades. Algunas de las aplicaciones más conocidas son las siguientes:

1. Como transportadores y adyuvantes en vacunas

Las “ nanopartículas” y los virus operan en la misma escala de tamaño, por lo tanto, las nanopartículas tienen la capacidad de ingresar a las células para permitir expresión de antígenos a partir de ácidos nucleicos suministrados (ARNm y vacunas de ADN) y/o se dirigen directamente a las células inmunitarias para la entrega de antígenos (vacunas de subunidades). Muchas vacunas emplean estos beneficios directos encapsulando material genómico o antígenos proteicos/peptídicos en nanopartículas como SLPs. Más allá de la administración de antígenos, las partículas pueden emplearse como adyuvantes para mejorar la respuesta inmunitaria [103]. Los adyuvantes son moléculas inmunoestimuladoras que se administran junto con la vacuna para ayudar a estimular la respuesta inmunitaria. Un nuevo desarrollo en el área de los adyuvantes son los sistemas de emulsión. Estas emulsiones se degradan rápidamente en el cuerpo, pero al estar en estado sólido, los componentes lipídicos de los SLPs se degradarán más lentamente, lo que proporcionará una exposición más duradera al sistema inmunológico [104]. Aunque el objetivo de la vacuna es estimular el reconocimiento y la respuesta de los linfocitos, la activación de la respuesta inmunitaria innata es necesaria para activar los linfocitos y obtener tanto las células B como las T. Por lo tanto, la encapsulación y/o conjugación de ambos, el adyuvante y el antígeno, dentro del mismo nanosistema permite una entrega dirigida y sincrónica a la misma presentación de antígeno.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

Uno de los ejemplos más recientes lo encontramos con el uso de SLPs en el tratamiento frente a la Covid-19. Actualmente, los primeros ensayos de vacunas frente al virus SARS-CoV-2 que se han autorizado (Moderna y Pfizer-BioNTech) encapsulan ARNm dentro de SLPs para proteger el ARNm de la degradación de nucleasas [105]. Además, debido a la escala “nano” de nanomateriales, así como su composición, estas SLPs pueden distribuirse en sistemas *in vivo* de manera diferente a otros materiales. El sistema linfático es fundamental para iniciar el sistema inmunológico y acceder a él puede ser un desafío, pero los nanomateriales pueden atravesar los espacios intersticiales y acceder a ellos a través de este sistema [106]. Aunque hasta ahora solo estas dos vacunas han sido aprobadas para su uso clínico, existen más candidatas a vacunas frente a la Covid-19 que emplean un sistema de encapsulación en SLPs. Algunos ejemplos son la vacuna Lunar® de Arcturus Therapeutics Inc. que se encuentra actualmente en fase I/II y tres más que se encuentran en ensayos de fase I [107].

2. En el tratamiento frente al cáncer

Desde las últimas dos décadas se han encapsulado varios agentes quimioterápicos en SLPs y se ha evaluado su eficacia tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*. En diversos estudios se ha demostrado que el empleo de SLPs como nanotransportadores de fármacos antineoplásicos mejora la eficacia y disminuye la toxicidad de estos. Por otro lado, la encapsulación de estos agentes quimioterápicos mejora el perfil farmacocinético y protege al fármaco de la degradación. Así, algunos de los inconvenientes que se encuentran con frecuencia con los compuestos anticancerígenos, como la escasa especificidad y estabilidad o la alta incidencia de células tumorales resistentes a los fármacos, se superan, al menos parcialmente, vehiculizándolos en estos nanosistemas [108]. Algunos ejemplos de esta eficacia mejorada se demostraron en estudios en los que se encapsularon los fármacos tamoxifeno, metrotexato y camptotecina en las SLPs en el tratamiento de tumores sólidos, más concretamente, en cáncer de mama.

3. Como transportadores específicos de fármacos al sistema nervioso central

El tamaño de partícula extremadamente pequeño que puede obtenerse de las SLPs, en algunos casos inferior a 50 nm, podría ser beneficioso con respecto al transporte de fármacos. Los SLPs pueden mejorar la capacidad del fármaco para penetrar a través de la barrera hematoencefálica y es un sistema prometedor de vehiculización de fármacos para el tratamiento de trastornos del sistema nervioso central. En un estudio para superar el acceso limitado del fármaco 5-fluoro-2'-desoxiuridina al cerebro, se sintetizó 3', 5'-dioctanoil-5-fluoro-2'-desoxiuridina y se incorporó a SLPs. La ventaja potencial del uso de SLPs sobre otras como las nanopartículas poliméricas viene indicado por una menor citotoxicidad, una mayor capacidad de carga de fármacos y la mejor escalabilidad de producción a nivel industrial [109].

4. Transporte de fármacos frente a enfermedades parasitarias

Las enfermedades parasitarias como (malaria, leishmaniasis, o tripanosomiasis) son uno de los principales problemas en todo el mundo, sobre todo en países en vías de desarrollo. La quimioterapia antiparasitaria es la única opción de tratamiento para estas infecciones parasitarias, sin embargo la aparición de resistencias a los tratamientos y la alta toxicidad de los mismos ha generado la necesidad de emplear nanosistemas de transporte de fármacos y las SLPs han mostrado potencial en

el tratamiento de estas infecciones parasitarias [110]. Algunos ejemplos sobre tratamientos antiparasitarios frente a la leishmaniasis se han demostrado en modelos murinos donde el fármaco (sulfato de paromomicina) encapsulado en SLPs mejoró la eficacia frente a *L. major* [111]. En el caso del tratamiento frente a la tripanosomiasis se demostró que el empleo de una terapia combinada del fármaco α -bisabolol encapsulado en SLPs junto a un quimioterápico, el diaceturato de diminazeno, mejoró la eficacia antiparasitaria con respecto a los compuestos por separado en modelos *in vivo* [112].

5. Tratamiento frente a enfermedades infecciosas como la tuberculosis

Las SLPs tienen una estabilidad más prolongada y una mejor eficiencia de encapsulación que los liposomas y, a diferencia de las nanopartículas poliméricas, el proceso de producción implica una cantidad mínima de disolvente orgánico. Las SLPs se han utilizado para encapsular fármacos antituberculosos y se ha demostrado esta alta tasa de encapsulación y una prolongada estabilidad en el tiempo [113]. Algunos fármacos como la rifampicina, la isoniazida y la pirazinamida mostraron mejor respuesta al disminuir la frecuencia de dosificación respecto al fármaco convencional [114, 115]. En otro estudio [116] se demostró que otro fármaco, la rifabutina, mostró una mejor acción antimicrobiana en modelos *in vivo* de ratón cuando el fármaco estuvo encapsulado en SLPs.

6. Su posible aplicación en diferentes rutas de administración

La investigación de estos nanosistemas ha ganado una gran importancia mundial debido a que un gran número de medicamentos se formulan utilizando esta técnica. Las SLPs se utilizan principalmente: en la vía parenteral transportando fármacos [33], encapsulando fármacos lipofílicos con el fin de mejorar su biodisponibilidad oral [117, 118], en la administración ocular de fármacos con el fin de mejorar su penetración corneal y su posterior acumulación local durante más tiempo [119, 120] por vía tópica para la administración de fármacos frente a diferentes enfermedades de la piel [121, 122] y para la administración de fármacos por vía pulmonar [123] y rectal [124, 125].

1.5. Liposomas

Los liposomas fueron descritos por Alec Bangham a comienzos de los 1960. Son los sistemas de transporte más estudiados para vehiculización de fármacos, principalmente en la industria farmacéutica y cosmética. Son vesículas de forma esférica compuesta de fosfolípidos y esteroides con un tamaño en un rango entre 50 y 450 nm [126]. Son considerados buenos transportadores de fármacos, principalmente porque muchos de los componentes de su estructura son similares a las membranas celulares y eso los hace biocompatibles y biodegradables [126]. También se ha demostrado que mejoran la estabilidad de los fármacos encapsulados, mejoran su biodistribución y permiten transportar fármacos, tanto hidrofílicos como hidrofóbicos. Además, son flexibles y no inmunogénicos, por lo que pueden administrarse por diferentes vías y mejoran la farmacocinética de los fármacos, disminuyendo su toxicidad [127, 128].

1.5.1. Clasificación de los liposomas

Los liposomas se pueden clasificar en base a sus métodos de preparación, al número de bicapas lipídicas presentes en la vesícula, a su tamaño o según su carga o grupo funcional superficial, como puede verse en la Figura 1.8. Cuando los liposomas contienen una sola bicapa lipídica o lamela, se denominan unilaminares. Cuando su tamaño es inferior a 100 nm se conocen como unilaminares pequeños (*small unilamellar vesicle*, [SUV]) y cuando su tamaño es superior a 100 nm, se conocen como vesículas unilaminares grandes (*large unilamellar vesicle*, [LUV]) [129]. Por otro lado, cuando los liposomas contienen una serie de bicapas lipídicas concéntricas, se denominan vesículas multilaminares (*multilaminar vesicles*, [MLV]). Cuando una vesícula contiene varias vesículas encapsuladas dentro de una sola bicapa, entonces se conoce como vesículas multivesiculares (*multivesicular vesicles*, [MVV]).

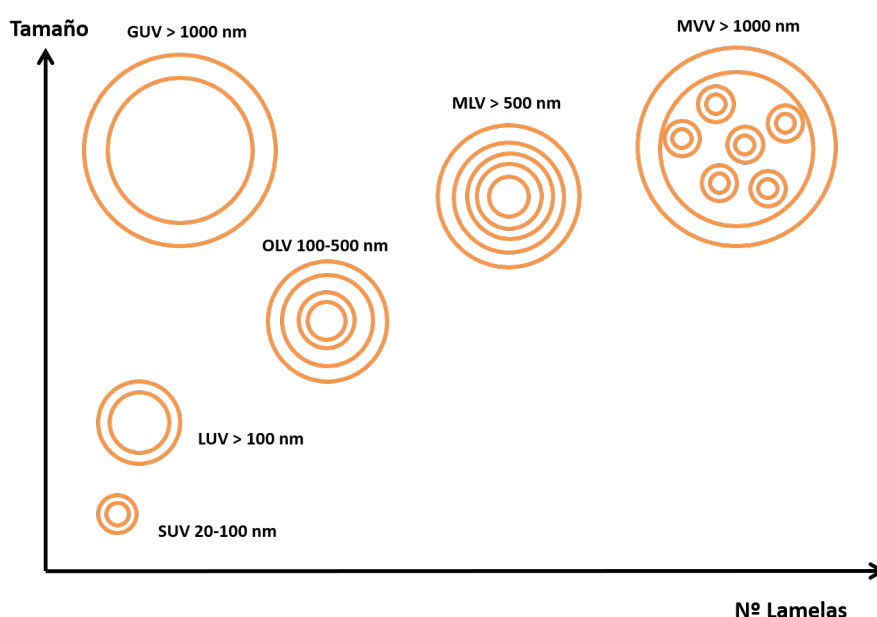


Figura 1.8: Clasificación de liposomas según su tamaño y el número de bicapas que presentan.

En los últimos años y con la finalidad de evitar los rápidos fenómenos de fagocitosis de los liposomas cuando son administrados por vía i.v. y conseguir que se mantengan en la circulación sistémica durante un período de tiempo más largo, se han desarrollado los denominados liposomas “Stealth” o de segunda generación. En estos liposomas la superficie es recubierta con cadenas hidrofílicas (p.ej. de polietilenglicol [PEG]) y con esta cubierta hidrofílica consiguen escapar del RES [130], como se ha explicado anteriormente. También se han diseñado liposomas dirigidos, conjugados con ligandos de direccionamiento específicos. Por lo que se puede considerar una segunda clasificación de los liposomas empleados en liberación de fármacos, en los siguientes cuatro grupos (resumidos en la Figura 1.9) [131]:

1. Convencionales: consiste en una serie de bicapas lipídicas compuesta por colesterol y fosfolípidos (catiónicos o aniónicos), rodeando a un espacio acuoso. En este caso,

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

tanto la bicapa lipídica como el núcleo acuoso pueden transportar en su interior fármacos hidrofóbicos o hidrofílicos, respectivamente.

2. Pegilados: se incorpora polietilenglicol a la superficie del liposoma para poder aumentar el tiempo de circulación y alcanzar el lugar de acción, ya que evita la adsorción de proteínas.
3. Dirigidos: empleando ligandos como anticuerpos, carbohidratos y péptidos pueden estar unidos a la propia superficie del liposoma o al extremo de las cadenas del PEG, previamente unido a su superficie.
4. Teranósticos: es una combinación de los tres tipos anteriores, ya que pueden incorporar fármacos y a su vez, funcionalizarse con ligandos de direccionamiento o con agentes de imagen [132].

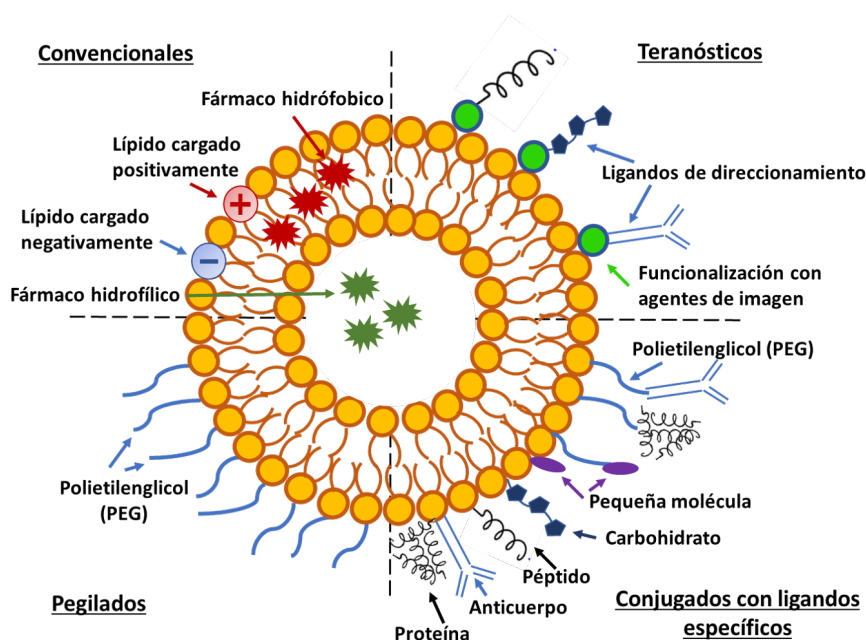


Figura 1.9: Clasificación de liposomas según su funcionalización superficial para la aplicación en la administración y liberación de fármacos [133].

Los liposomas (con fosfolípidos como componente principal) han recibido mayor atención que otros nanosistemas debido a que presentan propiedades únicas para administrar fármacos específicamente a las dianas farmacológicas. Los liposomas son vesículas esféricas unilaminares o multilaminares formadas principalmente por fosfolípidos, ya sean de origen vegetal o animal. Los liposomas se sintetizan formando estructuras esféricas cerradas y compuestas de una o más bicapas concéntricas lipídicas. Por su amplia gama de tamaños y su versatilidad debido a la naturaleza anfifílica de los fosfolípidos son unos de los nanosistemas más estudiados y la base de muchos medicamentos aprobados en el mercado o en fase clínica actualmente (Tabla. 1.6).

Como ya se ha explicado previamente, la administración de fármacos en estas nanovesículas ha sido prometedora debido a características como la biocompatibilidad o su

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

versatilidad a la hora de encapsular compuestos de diversa naturaleza o funcionalizando en superficie con ligandos y moléculas funcionales que les confieren propiedades para el transporte activo de fármacos y material genético [134–136]. Como otros nanotransportadores, los liposomas también presentan ciertos inconvenientes. Durante el diseño de una formulación de administración de fármacos para mejorar la eficacia terapéutica de los medicamentos, deben tenerse en cuenta los costes de producción, los cuales, en el caso de los liposomas, son altos [58, 137, 138]. De manera similar, se espera que los liposomas de naturaleza catiónica sean altamente tóxicos cuando se requieren dosis altas en el tratamiento, debido a un efecto de desestabilización de la membrana celular [139]. Otro inconveniente de la formulación liposomal es que hay falta de especificidad cuando se administran por vía intravenosa. Los liposomas pueden ser eliminados por el RES cuando está en la circulación sanguínea del organismo. Y pueden acumularse en los órganos propios del RES, como son bazo e hígado mediante un direccionamiento pasivo. El direccionamiento de los liposomas es un factor importante para su uso como transportador de fármacos, y el tamaño de partícula así como, la carga superficial son importantes para su direccionamiento *in vivo* [140]. En cuanto a los problemas de fabricación, la existencia de variaciones de lote a lote, la necesidad de una esterilización extensa, un control del tamaño de partículas, la posibilidad de presentar residuos de disolventes orgánicos o la temperatura de almacenaje han sido motivos de preocupación en su aplicación como transportadores de fármacos [58, 132, 138, 141].

1.5.2. Composición de los liposomas

Los fosfolípidos son moléculas anfifílicas que contienen un grupo de cabeza hidrofílica o polar y dos colas lipofílicas o apolares. Su naturaleza anfifílica los hace poco solubles en agua, a menos que se estructuren formando bicapas. Las moléculas de fosfolípidos se autoensamblan en una suma de bicapas cuando el disolvente orgánico se elimina por evaporación. En el proceso posterior de hidratación, las bicapas se separan muy lentamente y si se permite que los bordes de las bicapas se fusionen a un ritmo más rápido, se forman vesículas multilaminares. Incrementando la tasa de separación de bicapas mediante la aplicación de campos eléctricos se pueden obtener vesículas unilaminares [142].

Como se ha explicado previamente, las propiedades de los liposomas se ven afectadas no sólo por su composición, sino también por tamaño, carga superficial, número de lamelas, rigidez de la bicapa, modificación de la superficie y método de preparación [133]. Una de las características de los fosfolípidos que afecta a la formación del liposoma, es la temperatura de transición de los fosfolípidos (TC). Dicha temperatura es a la que los fosfolípidos cambian de estado gel a cristal-líquido [143]. La TC depende de la longitud de las cadenas de ácidos grasos y de su grado de saturación [144–146]. También determina la fluidez y la permeabilidad de las bicapas del liposoma. De hecho, a temperaturas inferiores a TC los fosfolípidos (fase gel), presentan baja fluidez y baja permeabilidad. Por el contrario, a temperaturas superiores a TC, los fosfolípidos están en fase cristal-líquido, mostrando mayor fluidez en sus cadenas. La longitud de las cadenas o la presencia de dobles enlaces también modifican la TC. Por lo tanto, el conocimiento de esta transición de fase puede utilizarse para modular el comportamiento de las bicapas lipídicas, aspecto que se ha aprovechado para mejorar características como la agregación de liposomas o la liberación de fármacos. Otro aspecto destacable es que las modificaciones de las regiones polares y no polares de los fosfolípidos naturales han permitido crear una amplia variedad de fosfolípidos sintéticos, que han demostrado ser más estables que los de origen natural [147].

Tabla 1.6: Medicamentos basados en liposomas aprobados por la FDA [25, 39].

Nombre Comercial	Fármaco	Nanosistema	Aplicación	Ventajas
Doxil®/Caelys™ (Janssen)	Doxorrubicina	Liposomas	Sarcoma de Kaposi; Cáncer de ovario; Mieloma múltiple	Incremento de acción en el tumor (especificidad), Disminución de la toxicidad
Abelcet® (Sigma-tau)	Anfotericina B complejo lipídico	Liposomas	Micosis	Disminución de la toxicidad
DaunoXome® (Galen)	Daunorrubicina	Liposomas	Sarcoma de Kaposi	Incremento de acción en el tumor (especificidad), Disminución de la toxicidad
DepoCyt® (Sigma-Tau)	Citarabina	Liposomas	Meningitis linfomatosa	Incremento de acción en el tumor (especificidad), Disminución de la toxicidad
AmBisome® (Gilead Sciences)	Anfotericina B	Liposomas	Infección por hongos o protozoos	Disminuye la nefrotoxicidad
Curosurf®/Poractant alfa (Chiese farmaceutici)	Surfactante pulmonar porcino	Liposomas	Activador pulmonar para el trastorno por estrés; Tensioactivo pulmonar para vías respiratorias síndrome de angustia	Disminuye la toxicidad y aumenta entrega de fármaco
Visudyne® (Bausch and Lomb)	Verteporfina	Liposomas	Histoplasmosis ocular, miopía, disminución de la visión	Aumenta la entrega específica al sitio (vasos de lesión) fotosensible
DepoDur® (Pacira Pharmaceuticals)	Sulfato de morfina	Liposomas	Liberación prolongada	Pérdida de dolor (post-operatorio)
Marqibo® (Onco TCS)	Vincristina	Liposomas	Leucemia linfoblástica aguda	Incremento de acción en el tumor (especificidad), disminución de la toxicidad

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

Por otro lado, los liposomas pueden presentar carga superficial positiva, negativa o neutra. La carga superficial puede afectar a propiedades como la estabilidad, la farmacocinética, la biodistribución de los liposomas, así como la captación celular. Los fosfolípidos cargados negativamente, como el *1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phospho-rac-(1-glycerol) sodium salt* (DMPG) o *dioleoyl phosphatidylserine* (DOPS), son reconocidos por los macrófagos y entran en la célula por endocitosis a un ritmo más rápido que los fosfolípidos neutros, como *hydrogenated soybean phosphatidylcholine* (HSPC) y *1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine* (DOPE), dando lugar a un tiempo de circulación más corto. Una pequeña carga negativa puede estabilizar los liposomas neutros aumentando las fuerzas electrostáticas repulsivas, que afectan al mecanismo de captación fagocítica dependiente de la agregación [133]. Por otro lado, los liposomas catiónicos interactúan con proteínas plasmáticas que mejoran la captación por parte del sistema fagocítico, promoviendo el aclaramiento por el pulmón, hígado o bazo. Además, la captación de liposomas con una carga positiva parece ser mucho mayor que la de los liposomas negativos. Por este motivo, los liposomas cargados negativamente son más comunes en la mayoría de las formulaciones de liposomas aprobadas por la FDA [143, 148, 149].

El colesterol tiene un papel importante en la preparación y las propiedades químicas de los liposomas. Esta molécula se acomoda junto a la cadena de fosfolípidos, con su grupo hidroxilo cerca de la región hidrofílica y sus anillos aromáticos paralelos a la cadena de ácidos grasos dentro de la bicapa, debido a interacciones hidrofóbicas. El colesterol, por tanto, disminuye la fluidez y la permeabilidad al agua debido al aumento de la rigidez mecánica de las bicapas [146, 150, 151]. Varias formulaciones liposomales clínicamente aprobadas, que incorporan colesterol ya están en el mercado. El colesterol actúa como estabilizador de las bicapas lipídicas: en su ausencia, los liposomas a menudo interactúan con proteínas, incluida la albúmina, transferrina, macroglobulina y lipoproteínas de alta densidad. Tal interacción desestabiliza la estructura de los liposomas y, en consecuencia, disminuye su capacidad como sistemas de administración de fármacos [150, 152, 153]. El colesterol también es crucial para la estabilidad estructural de las membranas de los liposomas frente al estrés ambiental intestinal [133].

Tabla 1.7: Ejemplos de fosfolípidos empleados en la síntesis de liposomas.

	Fosfolípidos	Abreviaturas
Naturales	Fosfatidilcolina	PC
	Fosfatidiletanolamina	PE
	Fosfatidilserina	PS
Sintéticos	Dioleoilfosfatidilcolina	DOPC
	Dioleoilfosfatidiletanolamina	DOPE
	Diestearoil fosfatidilcolina	DSPC
	Diestearoil fosfatidiletanolamina	DSPE

1.5.3. Técnicas de síntesis de los liposomas

Los liposomas se preparan mediante diferentes técnicas. La combinación de fosfolípidos con medio acuoso es el requisito básico en los métodos de preparación.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

Existen varios métodos convencionales de fabricación de liposomas. La diferencia entre los diversos métodos de síntesis es la forma en que los lípidos eliminan los disolventes orgánicos y luego se redispersan en medios acuosos. Estos métodos son fáciles de realizar, sin embargo, estas técnicas requieren grandes cantidades de solvente orgánico, que son nocivos, tanto para el medio ambiente como para la salud humana, requiriendo la eliminación completa del solvente orgánico residual. Además, estos métodos convencionales consisten en muchos pasos para la homogeneización del tamaño y consumen una gran cantidad de energía que no es rentable para la producción de liposomas a gran escala [154].

Todos los métodos de preparación de los liposomas involucran las siguientes etapas:

1. Eliminación del disolvente orgánico de la fase lipídica.
2. Dispersión del lípido en medio acuoso.
3. Purificación de los liposomas obtenidos.

La elección correcta del método de preparación de liposomas depende de los siguientes parámetros: 1) las características fisicoquímicas del compuesto a encapsular y las de los componentes del liposoma; 2) la naturaleza del medio en el que se dispersan las vesículas lipídicas; 3) la eficiencia de encapsulación de la molécula que se quiere cargar en el liposoma; 4) la vía de administración y la diana terapéutica; 5) el tamaño y polidispersión de las vesículas para la aplicación prevista y 6) la reproducibilidad de lote a lote y posibilidad de producción a gran escala de productos liposomales seguros y eficientes [155]. Los liposomas se fabrican en su mayoría utilizando varios procedimientos en los que los materiales solubles en agua (hidrófilos) quedan atrapados, utilizando una solución acuosa de estos materiales o mediante la adición de fármaco/solución en alguna etapa durante la fabricación de los liposomas. Los materiales solubles en lípidos (lipófilos) se solubilizan en la solución orgánica del lípido constitutivo y luego se evaporan formando una película de lípidos que contiene el fármaco seguido de su hidratación. Estos métodos implican la carga de los fármacos antes o durante el procedimiento de fabricación (carga pasiva). Sin embargo, cierto tipo de compuestos con grupos ionizables o aquellos que presentan solubilidad tanto en lípidos como en agua (moléculas anfipáticas), pueden introducirse en los liposomas después de su formación (carga activa) [156].

Las técnicas de carga pasiva incluyen tres métodos diferentes como puede observarse en la Figura 1.10. Dentro de los métodos de dispersión mecánica, el método de hidratación o método Bangham es de los más empleados. Cuando se preparan liposomas con composición mixta de lípidos, los lípidos primero deben disolverse y mezclarse en un solvente orgánico para asegurar una mezcla homogénea de los mismos. Por lo general, este proceso se lleva a cabo utilizando cloroformo o mezclas de cloroformo y metanol. La intención es obtener una solución para mezclar completamente los lípidos. Una vez que los lípidos se mezclan completamente en el disolvente orgánico, éste se elimina para producir una película de lípidos. Estos lípidos pueden almacenarse liofilizados para su posterior hidratación. La hidratación de la película lipídica se logra simplemente agregando un medio acuoso a la capa lipídica y agitando. La temperatura del medio hidratante debe estar por encima de la temperatura de transición gel-cristal líquido (TC) del lípido. Después de la adición de la solución acuosa, la suspensión de lípidos debe mantenerse por encima de la TC

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

durante el período de hidratación. Los procesos de mezcla o agitación vigorosa son muy recomendables en esta etapa. También se recomienda que la suspensión de vesículas repose durante 12 horas antes de reducir el tamaño porque facilita el proceso de formación de las vesículas y mejora la homogeneidad del mismo. El producto obtenido tras esta fase de hidratación corresponde a liposomas MLV. Una vez que se ha producido una suspensión de liposomas hidratada y estable, las partículas pueden reducirse de tamaño mediante una variedad de técnicas, que incluyen sonicación o extrusión [157].

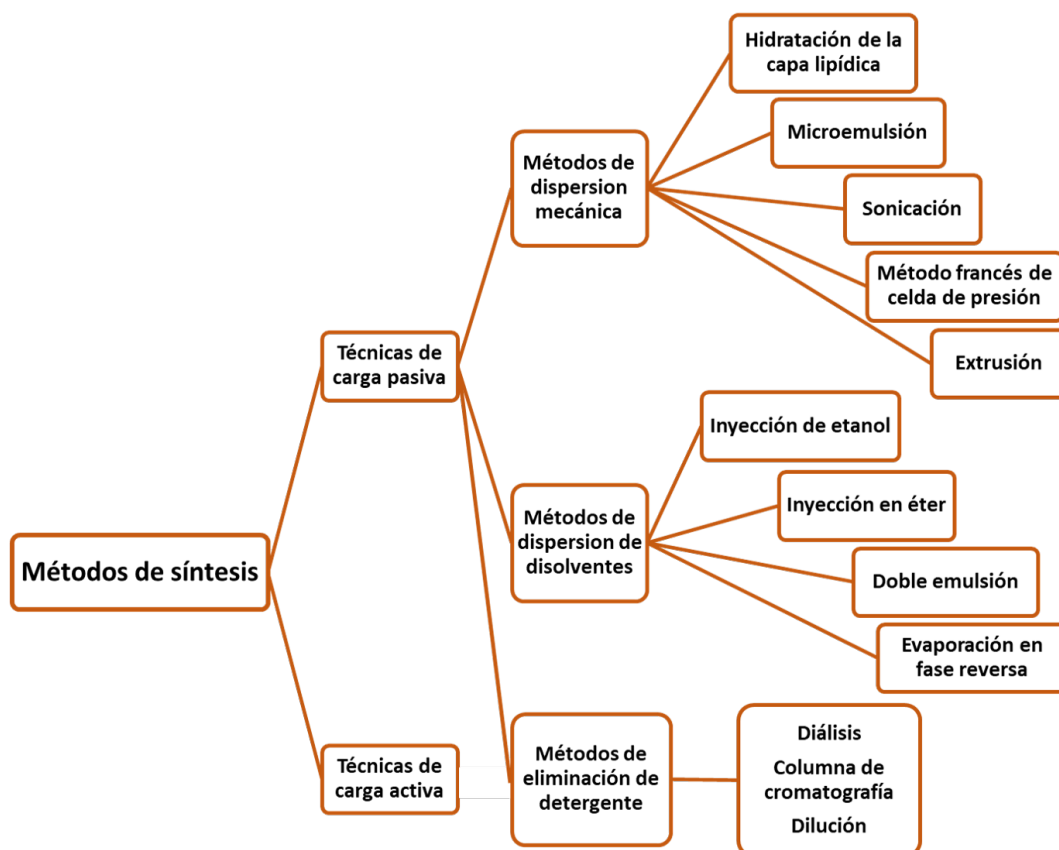


Figura 1.10: Diferentes métodos de síntesis de liposomas [138].

1.5.4. Encapsulación de fármacos en los liposomas

La eficiencia de encapsulación del fármaco, en condiciones estériles, la retención del fármaco, la facilidad de preparación y reproducibilidad de dicho proceso, así como la estabilidad de los liposomas y la rentabilidad, dependen de la selección del método de encapsulación del fármaco en liposomas. Del mismo modo que ocurre con las SLPs, hay formas diferentes de incorporar fármacos a los liposomas que se conocen como métodos de carga de fármacos pasivos y activos. En el método de encapsulación pasiva los fármacos quedan atrapados en liposomas durante su preparación, mientras que en el caso del método de carga activa, los fármacos se cargan en las vesículas intactas [158].

Encapsulación pasiva del fármaco

La encapsulación del fármaco en los liposomas mediante técnicas pasivas depende de la capacidad de los liposomas para capturar un volumen específico de la fase acuosa que contiene los fármacos o solutos disueltos durante la formación de vesículas [158]. En el caso de fármacos hidrofílicos, la eficiencia de encapsulación después del tratamiento pasivo es proporcional al volumen acuoso encerrado por las vesículas, que a su vez depende de la concentración de fosfolípidos de la dispersión, el número de lamelas y la morfología de las vesículas. La eficacia del atrapamiento (generalmente <30 %) está limitada por la solubilidad del fármaco. Por otro lado, los fármacos solubles en agua que tienen funciones de amina protonizables pueden ser atrapados activamente empleando gradientes de pH, lo que puede resultar en una eficiencia de encapsulación cercana al 100 % [159]. Los fármacos hidrofóbicos interactúan con la bicapa fosfolipídica, por lo que la eficiencia de encapsulación depende de la selección de fosfolípidos y sus concentraciones, lográndose en muchos casos, altas tasas de encapsulación [156]. Los parámetros morfológicos no afectan a la eficiencia de encapsulación del fármaco. Mediante la técnica de encapsulación pasiva, los fármacos solubles en agua quedan atrapados dentro de la fase acuosa del liposoma, mientras que los fármacos lipídicos quedan atrapados en las paredes de la bicapa (fase lipídica) del liposoma. Las sustancias anfifílicas quedarán atrapadas de tal manera que la parte lipofílica se incrustará entre los fosfolípidos liposomales, mientras que la porción soluble en agua estará ubicada en la fase acuosa liposomal.

Encapsulación activa del fármaco

Para la encapsulación activa del fármaco, las vesículas liposomales vacías ya preparadas se mezclan con una solución concentrada de fármaco. Después de la incubación, los fármacos se distribuyen en los liposomas mediante un proceso de difusión. Este método es ventajoso ya que la bicapa de fosfolípidos tiene un alto grado de permeabilidad para la difusión de los fármacos y, por tanto, el alto nivel de atrapamiento se produce en un tiempo razonable. Los fármacos penetran en las vesículas a través de las bicapas lipídicas siguiendo un gradiente de concentración hasta llegar al equilibrio entre el medio circundante y el interior de las vesículas [158]. Durante este método, los fármacos solubles en agua interactúan con los grupos de fosfolípidos de la cabeza polar y son secuestrados por los liposomas. La cantidad de fármaco hidrófobo que puede entrar en un liposoma depende de la permeabilidad del lípido de la bicapa y, como resultado, la formulación de liposomas para esta clase de fármacos cambia sustancialmente de un compuesto a otro. En el caso de los fármacos anfifílicos, es difícil que permanezcan dentro de los liposomas, ya que pueden penetrar rápidamente a través de las bicapas. El método tiene varias ventajas, ya que la sustancia activa no está presente durante la preparación de los liposomas, por lo tanto, las precauciones de seguridad que deben tomarse cuando se manipulan fármacos tóxicos puede minimizarse. La desventaja de este método es que está restringido a una pequeña gama de fármacos que se comportan como bases o ácidos anfipáticos débiles y pueden penetrar bicapas, pero no al estado acuoso [158, 160].

1.5.5. Caracterización de los liposomas

Para un control de calidad adecuado de las formulaciones liposomales, deben caracterizarse extensamente tanto después de su preparación como tras su almacenamiento. Para aplicaciones de liposomas en campos analíticos y bioanalíticos, las principales características deben incluir la determinación de la morfología, diámetro medio, índice de polidispersión, eficiencia de encapsulación y lamellaridad. Otros parámetros a tener en cuenta son la carga superficial a través de la medición del potencial zeta o las transiciones de fase a través de la técnica calorimetría diferencial de barrido (DSC).

1.5.6. Características de los liposomas

Como se ha mencionado anteriormente para las SLPs, los liposomas también presentan ventajas que se resumen a continuación:

1. Biodisponibilidad mejorada

Los avances en el diseño de liposomas está dando lugar a nuevas aplicaciones para la entrega de productos biotecnológicos, por ejemplo, oligonucleótidos, genes clonados y proteínas recombinantes. Diversos estudios definen la viabilidad de formular una amplia gama de fármacos administrados en liposomas, lo que frecuentemente resulta de una actividad terapéutica mejorada y/o una toxicidad reducida en comparación con el fármaco libre. Algunos ejemplos incluyen formulaciones liposomales de ácido trans-retinoico [161, 162] y daunorrubicina [163, 164], que ha recibido la aprobación de la FDA como tratamiento de primera línea del sarcoma de Kaposi avanzado relacionado con el SIDA (Tabla 1.6). Otros ejemplos de formulaciones liposomales donde se ha mejorado la biodisponibilidad de fármacos son, por ejemplo, la encapsulación de la vincristina, la doxorrubicina y la anfotericina B [165]. Por otro lado, la versatilidad de los liposomas permite administrar fármacos como soluciones (coloidales) [166], aerosoles [167] o en formas farmacéuticas (semi) sólidas, como cremas y geles [168].

2. Transporte pasivo

Para el funcionamiento adecuado y eficiente de la administración de fármacos, éstos deben poder permanecer en la circulación sistémica durante un período prolongado de tiempo. Al igual que ocurría con las SLPs, los liposomas convencionales también se eliminan rápidamente del cuerpo a través del RES. Para mejorar este problema se desarrollaron los liposomas de segunda generación. Debido a su tamaño nanométrico, los liposomas que no son capturados por el RES, pueden llegar al lugar de acción de manera pasiva mediante el efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR) [169, 170]. Este efecto se relaciona con la extravasación mejorada de macromoléculas en infartos, regiones de inflamación y tejidos tumorales debido a la presencia de vasculaturas con huecos y fisuras (Fig. 1.11) [132, 156]. Los liposomas tienden a acumularse más en sitios como el hígado y el bazo. Este hecho es importante si la diana farmacológica de estos nanosistemas se encuentra en estos órganos, aunque en el caso del cáncer esto puede conducir a un retraso en la eliminación de fármacos lipofílicos.

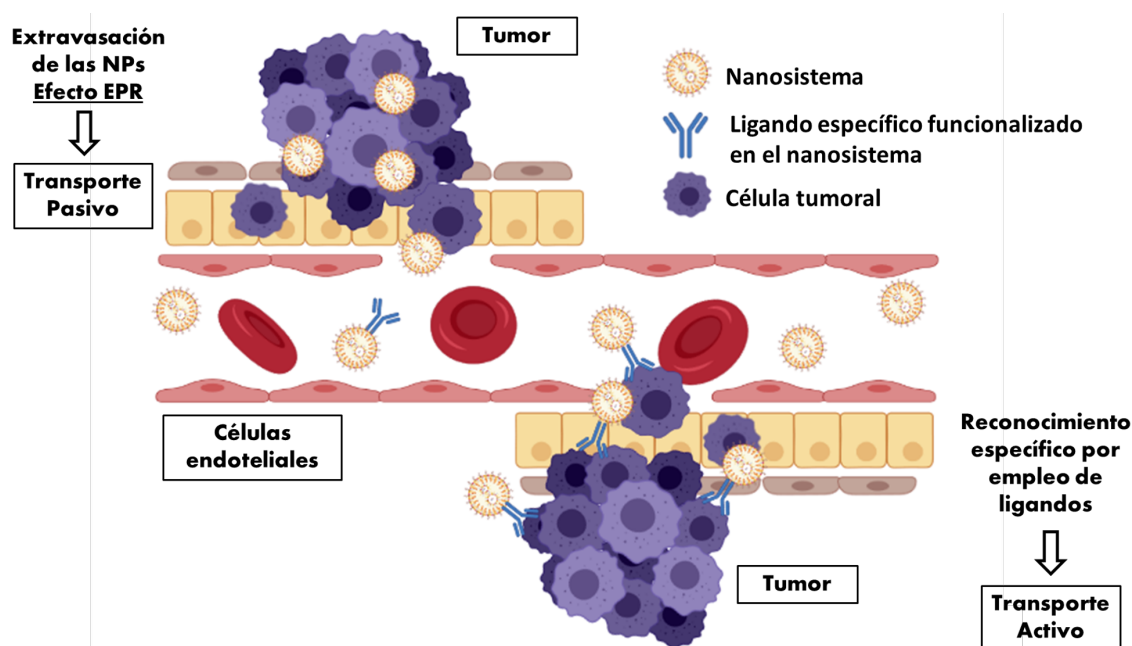


Figura 1.11: Transporte pasivo y activo de los nanosistemas transportadores de fármacos hacia un tumor por efecto EPR.

3. Direccionamiento activo

Además del direccionamiento pasivo, se pueden emplear estrategias de transporte activo de fármacos para obtener tratamientos terapéuticos rápidos. Para este propósito, se requiere que los nanosistemas de entrega activos sean eficientes en la unión específica a una célula o tejido determinado como ya se ha explicado anteriormente. Las formulaciones liposomales se han estudiado ampliamente para dirigirse a ciertas células específicas o dianas farmacológicas, utilizando ligandos específicos funcionalizados en el nanotransportador o receptores presentes en los tejidos y células diana (Fig.1.11). La administración activa de formulaciones liposomales utiliza, principalmente, ligandos acoplados químicamente expresados en las membranas de los liposomas. El desarrollo de un sistema de transporte requiere un conocimiento profundo sobre el tejido de destino, una vez superados varios obstáculos, para garantizar la entrega del fármaco en concentraciones terapéuticas. Cuando los liposomas con ligandos específicos en superficie acceden a las dianas farmacológicas, se produce la unión específica entre ligando y receptor y, posteriormente, dichos ligandos se internalizan en células y tejidos donde ejercerán su función.

1.5.7. Aplicaciones de los liposomas

Algunos ejemplos de aplicaciones donde se emplean liposomas como transportadores de fármacos son [137]:

1. En el tratamiento frente al cáncer

El transporte de quimioterápicos en liposomas utilizados en el tratamiento de cáncer mejora características del fármaco como la farmacocinética y la farmacodinámica. Los liposomas pueden dirigir un fármaco al lugar de acción aumentando su eficacia

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

terapéutica. La encapsulación de fármacos antineoplásicos dentro de los liposomas no sólo permite su acumulación en el sitio del tumor sino que la presencia de la bicapa de fosfolípidos previene al fármaco de posibles procesos degradativos antes llegar al tumor y a su vez, minimiza la exposición del mismo a los tejidos sanos. Como resultado, reduce la toxicidad de los tratamientos frente al cáncer [171, 172].

2. Transporte de fármacos frente a enfermedades bacterianas y parasitarias

La leishmaniasis conforma un grupo de enfermedades endémicas causadas por el parásito del género *Leishmania spp.* y como se ha explicado anteriormente, los fármacos presentan una elevada toxicidad y han comenzado a documentarse casos de resistencias. Los liposomas pueden emplearse para transportar estos fármacos, ya que debido a su captación por el RES, llegan a acumularse dentro del macrófago, célula diana de infecciones bacterianas y parasitarias, como la leishmaniasis. Esta acumulación dentro del macrófago permite la liberación del fármaco *in situ*, disminuyendo la toxicidad de los tratamientos [173, 174]. Uno de los ejemplos más relevantes es la formulación liposomal de anfotericina B comercializada como Ambisome® que ha demostrado una mayor eficacia terapéutica cuando ha ido vehiculizada en liposomas. Otros estudios han encapsulado miltefosina, sulfato de paramomicina y antimonio de meglumina, demostrando una eficacia del 90 % en modelos murinos [175]. En otro estudio, los liposomas fueron funcionalizados con ligandos (manosa y N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa) que permiten la interacción con receptores presentes en el macrófago, desencadenando el reconocimiento, activación y posterior endocitosis de estos nanosistemas [174].

3. Como adyuvante en vacunas

Como se ha explicado previamente, los liposomas son captados rápidamente por los macrófagos, empleando esta capacidad para la vacunación y activación de estas células. En inmunología, desde la primera aplicación de los liposomas como adyuvantes en vacunas por el estudio de Allison y Gregoriadis [176], los antígenos encapsulados en liposomas se han desarrollado para la producción de anticuerpos. A día de hoy, los liposomas se utilizan como adyuvantes inmunológicos mostrando eficacia en modelos experimentales frente a infecciones virales, bacterianas, parasitarias e incluso frente a tumores [128, 177]. Aunque en la actualidad, dentro de los candidatos desarrollados como posibles vacunas frente a la Covid-19, los nanosistemas lipídicos empleados son SLPs, los liposomas catiónicos también podrían usarse para aplicaciones de vacunas basadas en ARNm, como el agente de transfección ampliamente utilizado, lipofectamina compuesta de (N-(1-(2,3-dioleil oxi) propil)-N-(2-(espermina carboxamido)) trifluoroacetato de etil) -N, N-dimetilamonio (DOSPA) y (DOPE) [107]. En particular, un estudio reciente informó sobre una vacuna de ARNm de melanoma. El sistema optimizado de administración de ARNm codificó varios antígenos de cáncer para inducir fuertes respuestas de células T específicas de antígeno, lo que condujo a la regresión del tumor. Estos hallazgos indicaron que la vacunación con ARN-Liposomas es una inmunoterapia potente en pacientes con melanoma [178].

4. Vehiculización de antimicrobianos

Los liposomas aumentan el efecto de los antimicrobianos por dos razones principales: porque su naturaleza lipídica, que recubre a fármacos de naturaleza hidrofílica, permite la entrada de estos fármacos en las células de forma más eficaz y rápida, mejorando la eficacia terapéutica del mismo y en segundo lugar, protegen el antimicrobiano de

fenómenos de degradación enzimática. Este hecho es de gran importancia en el caso de penicilinas y cefalosporinas que pueden verse degradadas por el efecto de las enzimas beta-lactamasas, producidas por ciertos microorganismos [167, 179].

5. El empleo de liposomas en Biotecnología

Los liposomas pueden transportar no solo fármacos, sino también material genético debido a su naturaleza lipídica, muy similar a los componentes de las membranas celulares [180].

6. Empleo de liposomas en técnicas de diagnóstico

Además del área terapéutica, los liposomas también son efectivos en el área de diagnóstico, mediante la encapsulación de agentes de contraste y el posterior empleo de técnicas de resonancia o de imagen [181].

7. Aplicación en la industria cosmética

En el campo dermatológico y cosmético, los liposomas son utilizados por presentar características como una alta penetración y difusión de principios activos, transporte de estos de forma específica, un control en la liberación de los mismos, mayor estabilidad de principios activos, reducción de efectos secundarios no deseados y alta biocompatibilidad. Entre sus aplicaciones se encuentra su empleo como agentes con alta capacidad de hidratación [182] o para el transporte de fármacos en el tratamiento de trastornos asociados a los folículos pilosos, como el acné [183].

8. Aplicación en la industria alimentaria

Los liposomas se han empleado para desarrollar nuevos sabores, controlar su liberación, mejorar el color de los alimentos y modificar la textura de estos. Diversos estudios han demostrado que agregar proteasas al queso reduce el coste y el tiempo de preparación de éste [184]. También se han empleado para encapsular enzimas con el objetivo de estabilizar procesos de fabricación y de conservación de alimentos.

1.6. Tratamiento del cáncer metastásico empleando la Nanomedicina

1.6.1. Cáncer metastásico

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo, con una tasa de 9,6 millones de muertes en 2018, es decir, una de cada seis muertes se debe al cáncer. La palabra cáncer es un término muy amplio que abarca un conjunto de síndromes que presentan diferente etiología, desarrollo y pronóstico. Sin embargo, todos ellos tienen algo en común: se produce un descontrol de la proliferación celular de manera anárquica y progresiva. Existen unas características distintivas del cáncer conocidas como *hallmarks* que permiten comprender las complejidades de esta enfermedad [185]. Detrás de estas “señas de identidad” se encuentra la inestabilidad del genoma. Existen muchos tipos de cáncer, pero todos tienen su origen cuando células normales sufren mutaciones. Estas mutaciones pueden ser responsables de que una célula empiece a multiplicarse sin control, otras mutaciones agravan el problema, p.ej. haciendo que las

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

células tumorales eludan al sistema inmune, en algunos casos, engañando al organismo para evitar la respuesta inmune debido a que las células cancerosas son versiones mutantes de las propias células, por lo que el sistema inmune no suele considerarlas foráneas o reclutando a las células inmunes para acelerar el proceso canceroso [186]. Estas mutaciones también pueden atraer hacia sí nuevos vasos sanguíneos, creando una red de ellos para el suministro de nutrientes y oxígeno. Este proceso se conoce como angiogénesis y se desencadena por situaciones de hipoxia y acidosis en el tumor [187]. Otro de los problemas que pueden agravar el cáncer es cuando se produce la invasión de órganos vecinos por células tumorales al difundirse por el organismo, a este proceso se le conoce como metástasis (Fig. 1.12) [188]. Diversos estudios han demostrado que, en distintos tipos de tumores primarios, existen diversas poblaciones celulares que evolucionan de forma totalmente independiente. Por ejemplo, se ha observado que los procesos de metástasis de muchos pacientes, proceden de poblaciones celulares tumorales minoritarias que se desarrollaron en estadios tempranos de la enfermedad. Esta heterogeneidad característica de las células que conforman un tumor podría explicar la escasa eficacia de las terapias actuales contra el cáncer a largo plazo [189]. Esta pequeña población dentro del tumor primario, adquiere las mutaciones necesarias como para poder invadir tejidos circundantes y tejidos distantes, produciendo metástasis. Se sabe que cuando las células normales pierden el contacto con la matriz extracelular o las células vecinas, mueren por anoikis, una forma de muerte celular programada. Sin embargo, las células tumorales han desarrollado mecanismos para resistir a este proceso y sobrevivir mientras viajan a través de los sistemas circulatorio y linfático [190].

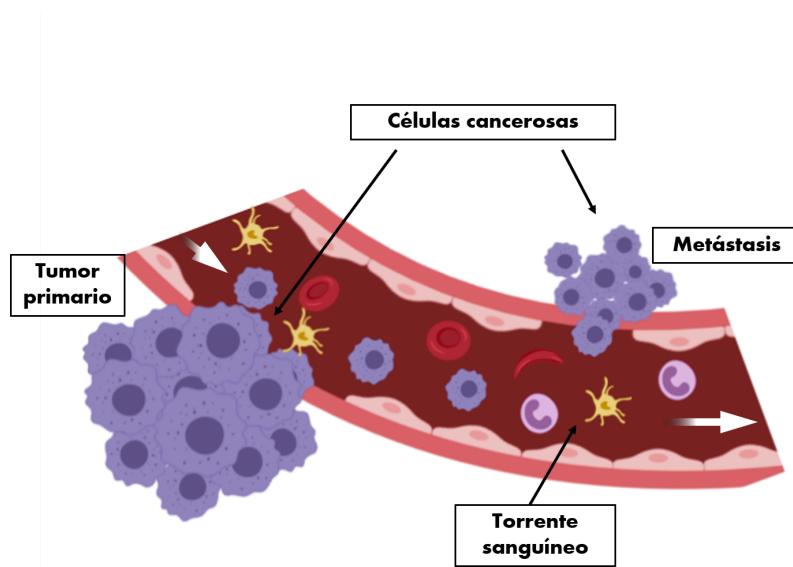


Figura 1.12: Desarrollo de un cáncer metastásico.

A pesar de que la metástasis es la principal causa del fracaso de la terapia del cáncer y de su mortalidad, sigue siendo poco conocida. En pacientes con cáncer, diariamente son liberadas grandes cantidades de células cancerosas a la circulación, sin embargo, los estudios de melanoma en modelos animales sugieren que $<0,1\%$ de esas células tumorales son capaces de desarrollar una metástasis [191]. El desarrollo de una metástasis requiere de unos determinados pasos o sucesos que pueden esquematizarse de la siguiente manera:

1. Invasión a través de la membrana basal y las células estromales.
2. Intravasación en la vasculatura tumoral con la entrada de las células cancerosas a la luz de los vasos sanguíneos o linfáticos.
3. Supervivencia de las células en circulación.
4. Extravasación al parénquima de los órganos distantes.
5. Supervivencia y manipulación de microambientes extraños formando micrometástasis que más tarde pueden convertirse en macrometástasis clínicamente relevantes, a esta última etapa se le conoce como colonización [191].

Como se ha explicado, la formación de la metástasis implica una cascada de sucesos para los cuales los mecanismos subyacentes aún no se conocen bien. Sin embargo, se conoce que durante la cascada metastásica, las células cancerosas interactúan estrechamente con el sistema inmunológico, tanto en el microambiente del tumor como a nivel sistémico. La diafonía entre el cáncer y las células inmunes agrega más complejidad al proceso de la formación de metástasis, pero al mismo tiempo abre nuevas oportunidades terapéuticas para los pacientes con cáncer. El tratamiento actualmente puede ayudar a prolongar las vidas de algunas personas con cáncer metastásico. Aunque, en general, el objetivo del tratamiento frente al cáncer metastásico consiste en aliviar los síntomas o controlar su crecimiento. Los tumores que desarrollan metástasis pueden causar un grave daño en el funcionamiento del organismo, y la mayoría de la gente que muere por cáncer es debido a la enfermedad metastásica. Por lo que, el cáncer metastásico es uno de los mayores desafíos en la terapia del cáncer, causante de más del 90 % de muertes relacionadas con el cáncer [191–194].

Actualmente, el tratamiento del cáncer implica el uso de una combinación de cirugía, radioterapia, quimioterapia e inmunoterapia. Normalmente, después de la extirpación quirúrgica del tumor, se requiere radiación y quimioterapia para erradicar cualquier reminiscencia de células o tejidos tumorales que minimicen o anulen la reaparición de la enfermedad. El arsenal terapéutico actual de quimioterápicos es muy variado, los agentes alquilantes (platinos, derivados de la mostaza nitrogenada, oxazofosforinas), los antibióticos citotóxicos (antraciclinas, bleomicina, mitoxantrona), los antimetabolitos (análogos de pirimidina, antifolatos), los derivados de plantas (alcaloides de la vinca, taxanos) o los inhibidores de la topoisomerasa (inhibidores de topoisomerasa-I, Inhibidores topoisomerasa-II), son algunos ejemplos de los fármacos comercializados contra el cáncer. Todos estos fármacos tienen en común que actúan inhibiendo la división celular de las células cancerosas. Desafortunadamente, estos medicamentos tienen baja especificidad, una ventana terapéutica estrecha y toxicidad a dosis altas. Esto supone un inconveniente en muchos tratamientos porque, en su mayoría, estos se administran cerca de la dosis máxima tolerada [195]. Estos problemas han llevado a una aplicación limitada de estos fármacos y, en consecuencia, a un aumento constante por explorar nuevas formas de administrar quimioterápicos, ya sean de última generación u otros más antiguos que hayan pasado a ser de segunda línea de tratamiento, o directamente, hayan dejado de emplearse. En los últimos años a pesar del progreso en el desarrollo de nuevas sustancias activas, terapias dirigidas y regímenes combinados, el tratamiento frente al cáncer metastásico es todavía muy pesimista, en la mayoría de los casos con una mejora en la supervivencia de unos meses como máximo [192, 196–199].

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

Otra estrategia que se está empleando en el tratamiento del cáncer es el uso de inmunoterapia. Dentro de este campo, la aplicación de anticuerpos monoclonales (mAb) a la oncología se inició con la introducción y aprobación de bevacizumab (Avastin), un anti-factor de crecimiento endotelial vascular, y de cetuximab (Erbix), un factor de crecimiento anti-epidérmico. En combinación con los regímenes de quimioterapia estándar, bevacizumab prolonga significativamente la supervivencia de los pacientes con cánceres metastásicos de colon, mama y pulmón. Cetuximab, usado solo o con quimioterapia de rescate, produce respuestas antitumorales clínicamente significativas en pacientes con cánceres de colon y recto resistentes a la quimioterapia. Además, se ha demostrado que el anticuerpo anti-HER2/rastuzumab (Herceptin), en combinación con la quimioterapia adyuvante estándar, reduce las recaídas y prolonga la supervivencia en pacientes de alto riesgo después de la terapia local frente al cáncer de mama [200]. Por otro lado, también se encuentran los conjugados anticuerpo-fármaco que son inmunoconjugados compuestos por un anticuerpo monoclonal unido a un fármaco citotóxico. Este sistema está diseñado para entregar selectivamente el fármaco a las células cancerosas. Hasta la fecha, cinco inmunoconjugados han recibido aprobación en el mercado y más de 100 están siendo investigados en varias etapas de desarrollo clínico [201, 202]. La quimioterapia presenta problemas por falta de especificidad sobre células tumorales o problemas de resistencias. La resistencia a múltiples fármacos (MDR, del inglés *multidrug resistance*) en los cánceres sigue siendo la principal causa del fracaso de la quimioterapia en más del 90 % de los tumores. Los mecanismos más comunes de la MDR en el cáncer incluyen principalmente: el aumento del efecto de bomba de flujo de los transportadores ABC sobreexpresados, la reparación mejorada del daño del ADN inducido por fármacos, la apoptosis bloqueada, la modificación metabólica y desintoxicación. Hasta ahora, las sobreexpresiones de tres transportes ABC típicos, glicoproteína-P (P-gp), proteínas de resistencia a múltiples fármacos (MRP, del inglés *multidrug resistance protein*) y proteína de resistencia al cáncer de mama (BCRP, del inglés *breast cancer resistance protein*), se han reconocido como las causas más comunes de MDR en el cáncer [203].

Ante este problema los nanotransportadores de fármacos han demostrado ya en el pasado un enorme potencial para la administración eficaz de fármacos en el tratamiento de diversas enfermedades, incluido el cáncer [60]. Tras muchos estudios, se ha observado que la vehiculización de quimioterápicos en nanosistemas presenta muchas ventajas respecto al tratamiento con quimioterapia convencional en aspectos como una disminución de los efectos adversos, menor resistencia al fármaco y un mejor cumplimiento del régimen terapéutico por el paciente. A continuación, se van a detallar algunos estudios que han mostrado mejores resultados en el tratamiento frente al cáncer metastásico.

1.6.2. Nanosistemas de transporte de fármacos frente al cáncer metastásico

De entre los tipos de cáncer que existen, el melanoma representa solo el 4 % de todos los cánceres de piel y causa el mayor número de muertes relacionadas con el cáncer de piel a nivel mundial. La incidencia de melanoma cutáneo primario ha aumentado constantemente y se duplica cada 10-14 años [204]. El melanoma surge de la aparición de mutaciones genéticas en los melanocitos, las células productoras de pigmento. Una vez que esta enfermedad se convierte en metastásica, el pronóstico es muy pesimista. Por lo

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

tanto, la identificación temprana de este cáncer es crucial para el éxito del tratamiento del paciente, aunque la eficacia de estos tratamientos puede verse disminuida debido al desarrollo de diversos mecanismos de resistencia. [205].

Entre las terapias convencionales para el melanoma, que incluyen cirugía y radioterapia, la quimioterapia suele tener un papel importante que desempeñar. Dacarbazina y temozolomida son los dos fármacos que se utilizan específicamente contra el melanoma, aunque como terapia única han mostrado una eficacia deficiente [206]. Además las células de melanoma exhiben resistencia intrínseca a la quimioterapia a través de varios mecanismos [207]. Surge así una alternativa terapéutica que actúa potenciando la respuesta inmune contra este cáncer de piel [208], la inmunoterapia. Los inmunoestimuladores más utilizados para el tratamiento de melanoma son: la interleucina-2 (IL-2), el interferón (IFN)- α , el ipilimumab (es un anticuerpo monoclonal que bloquea los receptores CTLA-4) y la timosina α -1 [209]. Pese a los diferentes tratamientos, la naturaleza altamente resistente del melanoma hace que se requieran terapias dirigidas específicamente que actúen frente a los mecanismos de aparición del melanoma y su progresión. Entre ellos encontramos los inhibidores de BRAF que inducen una rápida regresión de la metástasis y los inhibidores de MEK, otro gen de la misma cascada de señalización [204]. Las principales limitaciones en el uso de inhibidores de BRAF son el desarrollo de resistencia en casi todos los casos y la toxicidad asociada con la inhibición de BRAF [210].

La terapia combinada es la estrategia más común para tratamiento del melanoma en estos días debido a la naturaleza agresiva de este cáncer y el efecto insuficiente producido por fármacos quimioterapéuticos cuando se usan solos. La dacarbazina puede ser combinado con otros fármacos citotóxicos como cisplatino o nitrosoureas. La combinación de inhibidores de BRAF y MEK también se emplean en pacientes con melanomas que presentan mutaciones BRAF. Esto se debe principalmente al desarrollo de resistencias con el uso de inhibidores de BRAF como agente único [206].

A pesar de los rigurosos esfuerzos en el campo del tratamiento del melanoma, este cáncer sigue siendo un importante desafío para la salud por su carácter resistente y agresivo. Varios tipos de nanopartículas y nanovesículas se han explorados para sus aplicaciones en el tratamiento, ya sea como vehiculizadores de fármacos o como agentes con actividad antineoplásica intrínseca. El empleo de nanotubos de carbono [211], nanopartículas de cobre [212], nanopartículas de oro [213, 214], nanoemulsiones [215] y nanosistemas lipídicos [216, 217] han mostrado una mejora en la eficacia terapéutica tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* [206].

Por otro lado, el cáncer de pulmón es la causa más frecuente de muerte relacionada con el cáncer en todo el mundo. A pesar de los avances en técnicas de detección precoz y mejora significativa de los procedimientos quirúrgicos, la tasa de supervivencia del cáncer de pulmón sigue siendo muy baja [218]. En muchos casos esto es debido a que uno de los principales problemas de este cáncer es que, en el momento del diagnóstico, el tumor ya se ha diseminado a los ganglios linfáticos, agravando el pronóstico del paciente [219]. Debido al conocido papel del sistema linfático en la propagación de las células tumorales [220, 221], el empleo de nanovehiculizadores de fármacos, no sólo al tumor sino

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

también a los ganglios linfáticos, se ha visto como una estrategia terapéutica para controlar la diseminación metastásica y reducir la toxicidad sistémica en estos casos. En este sentido, varios estudios ya han mostrado la capacidad de diferentes nanotransportadores, incluidas micelas [144, 222, 223], nanopartículas [224–226] y nanocápsulas [227], de mejorar la administración de medicamentos contra el cáncer a los nódulos linfáticos. Los resultados de estos estudios han subrayado la eficacia terapéutica mejorada del fármaco contra el cáncer cuando son transportados en nanosistemas, en comparación con las correspondientes formas farmacéuticas convencionales. Además, el conocimiento generado en este campo ha propiciado la conclusión de que el tamaño de las partículas y la hidrofilia de la superficie pueden influir en la distribución de los nanosistemas en el tejido linfático [228]. Es decir, los estudios han demostrado que los nanotransportadores con un tamaño de partícula cercano a 100 nm, potencial zeta negativo [229] y una superficie hidrófila [221, 230] pueden migrar a través del intersticio y acumularse en los ganglios linfáticos después de la administración subcutánea (s.c.). También se ha demostrado que tras la administración i.v., los nanosistemas de muy pequeño tamaño de partícula (generalmente menos de 100 nm) pueden extravasarse del torrente sanguíneo al intersticio y ser drenados por el sistema linfático [222, 231]. En este contexto, el grupo de Borrajo y cols. [232] desarrollaron nanocápsulas de ácido poliglutámico (PGA)-PEG, con capacidad para encapsular fármacos hidrófobos como el docetaxel y con una afinidad potencial por el sistema linfático. Después de la administración intravenosa a ratones, estas nanocápsulas condujeron a un aumento en la eficacia de los fármacos asociados, junto con una reducción de su toxicidad sistémica, en comparación con las correspondientes formulaciones control en un modelo de cáncer de pulmón metastásico. Este mismo grupo demostró que las nanocápsulas de PGA-PEG de 100 nm se acumularon en los ganglios linfáticos más rápido que los nanosistemas de mayor tamaño (200 nm) tras la administración s.c.

1.6.3. Vehiculización de antineoplásicos en partículas sólidas lipídicas

Tras analizar diversos estudios donde los nanotransportadores de fármacos han mostrado su potencial eficacia frente a tumores metastásicos, uno de los nanosistemas más investigados en los últimos años, los nanosistemas sólidos lipídicos también han mostrado ser potencialmente útiles frente a los procesos metastásicos. En apartados anteriores ya se ha hablado de las ventajas que presentan los nanosistemas basados en lípidos frente a otros transportadores. Las SLPs y los NLCs son formas comunes de partículas lipídicas utilizadas en el tratamiento del cáncer y han demostrado una mejora en el perfil farmacocinético de muchos fármacos. Esto se ha documentado también en el cáncer, con una mayor acumulación específica de estos nanosistemas en el tumor y una biodistribución reducida que implica una disminución en la toxicidad de los antineoplásicos encapsulados [66].

Uno de los antineoplásicos que más se ha estudiado para ser encapsulado en nanotransportadores es el paclitaxel (PX) debido a que presenta un perfil farmacocinético inadecuado en su uso en clínica. El PX es uno de los agentes quimioterapéuticos más eficaces contra el cáncer y se usa, principalmente, para tratar cánceres de pulmón, de ovario y de mama. Debido a su baja solubilidad en agua, está formulado en una mezcla de 50:50 % (v/v) aceite de ricino polioxetilado (Cremophor EL) y etanol deshidratado bajo la marca comercial “Taxol®”. Sin embargo, se sabe que el Cremophor EL está asociado con

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

efectos secundarios, como hipersensibilidad. Para superar este problema, en los últimos años se ha realizado una gran cantidad de investigaciones para formular el PX en diferentes nanosistemas, como emulsiones O/A, micelas [233], liposomas y partículas sólidas lipídicas [234]. Estas formulaciones han mostrado algunos beneficios en comparación con el Taxol® tanto *in vitro* como en *in vivo*. Sin embargo, en la mayoría de los casos la solubilidad del PX en estas formulaciones fue limitada y se liberó PX rápidamente de la formulación.

Cuando el PX fue encapsulado en un nanosistema lipídico [235] se observaron beneficios en el perfil de liberación, ya que solo el 50 % del fármaco se liberó en medio fisiológico (PBS) después de 72 horas. Para mejorar aún más la lipofilicidad del PX y facilitar su retención en el núcleo lipídico, se llevó a cabo la modificación del PX a un derivado graso. El derivado graso es el ácido docosahexaenoico-PX (DHA-PX) con el que se han realizado diversos ensayos clínicos en el tratamiento de varios tipos de cánceres [236]. El conjugado DHA-PX no tiene actividad de ensamblaje de microtúbulos y presumiblemente no es tóxico. Se mostró una exposición prolongada del PX y una reducción de su concentración máxima en sangre, que permitió una dosis máxima tolerada 4,4 veces mayor de DHA-PX en comparación con el Taxol® en ratones.

El PX unido a albúmina (nab-Paclitaxel) es una formulación de PX que se desarrolló, inicialmente hace más de una década, para superar las toxicidades asociadas con los disolventes utilizados en la formulación del PX y para mejorar potencialmente la eficacia. El nab-Paclitaxel ha demostrado ventajas sobre el paclitaxel al poder administrar una dosis más alta del fármaco a los tumores y disminuir la incidencia de toxicidades graves, incluidas reacciones alérgicas graves. Hasta la fecha, nab-Paclitaxel (Abraxane®) se ha indicado para el tratamiento de tumores sólidos [237].

El etopósido, se utiliza en el tratamiento de una gran variedad de tumores, incluido el cáncer de pulmón de células pequeñas, el cáncer testicular, linfomas y leucemias. El etopósido es uno de los fármacos quimioterapéuticos utilizados frente a tumores metastásicos, inhibiendo la topoisomerasa II [238]. El principal inconveniente en la formulación del etopósido es su lipofilicidad. Las formulaciones convencionales disponibles en el mercado contienen muchos solubilizantes, que están asociados con efectos secundarios, como hipotensión, anafilaxia, broncoespasmo, etc. Además, la administración sistémica convencional de etopósido tiene una corta semivida plasmática *in vivo* y presenta gran toxicidad. Estas dificultades han impulsado la necesidad de desarrollar sistemas especializados que permitan la encapsulación de este fármaco para la entrega selectiva a las células cancerosas. Un estudio llevado a cabo por Athawale y cols. [239] tuvo como objetivo desarrollar SLPs biodegradables cargadas del etopósido para reemplazar la terapia convencional de administración intravenosa continua. El estudio demostró que la eficacia del etopósido mejoró mediante la preparación y optimización de SLPs en su testeo en ensayos *in vitro* e *in vivo*. La liberación del etopósido fue sostenida en el tiempo debido a la encapsulación del fármaco en un sistema de matriz homogénea (Tipo III) (Fig. 1.7), actuando de forma eficaz frente a cultivos celulares de melanoma murino. Además, los parámetros farmacocinéticos del etopósido mejoraron tras la administración del fármaco en las SLPs. El patrón de biodistribución representó una distribución mejorada del fármaco en el hígado y los pulmones *in vivo*, los estudios de modelos tumorales indicaron una reducción significativa en el número de colonias tumorales metastatizadas con el tratamiento del

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

fármaco encapsulado en las SLPs, ya que se logró una alta concentración de etopósido en el pulmón e hígado con la administración de las SLPs.

El cáncer de mama es uno de los cánceres más frecuentes, pero la metástasis en ganglios linfáticos, que conduce a recaídas, es uno de los factores decisivos en la eficacia del tratamiento debido a la gran cantidad de nódulos linfáticos que hay cerca de la mama, especialmente en las axilas. La mitoxantrona (MTO) es un fármaco que se usa a menudo para tratar el cáncer de mama clínicamente. La toxicidad cardíaca y la mielosupresión se documentaron en pacientes individuales con leucopenia, y es una toxicidad local inducida por inyección s.c. que en este caso, es más grave que la inyección i.v. o intraperitoneal (i.p.) [240]. Se sintetizaron SLPs cargadas de mitoxantrona y el efecto terapéutico de MTO-SLPs fue prometedor en términos del peso del tumor o del porcentaje de inhibición del mismo [241]. Los resultados mostraron que las SLPs de tamaño <100 nm parecen ser un sistema transportador prometedor para agentes antitumorales contra el cáncer de mama con metástasis en ganglios linfáticos. Recientemente, en otro estudio [242] se coencapsuló la mitoxantrona (MTO) y un inhibidor de la glicoproteína P (P-gp) en SLPs para revertir la resistencia múltiple a fármacos en la leucemia.

Además de los cánceres hasta ahora mencionados, también se han estudiado diferentes tratamientos para el carcinoma colorrectal (CCR). Este tumor es uno de los más frecuentes en hombres y mujeres en el mundo occidental, en términos de incidencia y mortalidad [243]. La capacidad de estas células de invadir y metastatizar a otros órganos es responsable de la mayoría de las muertes. Los factores de riesgo están involucrados en su desarrollo. Se sabe que el butirato (ácido graso derivado de la fermentación por la flora colónica) es absorbido por las células epiteliales del colon y sirve como una fuente importante de energía. Su ausencia está asociada con atrofia de la mucosa y muerte de las células del colon. Este compuesto ha recibido mucha atención como agente quimiopreventivo, especialmente porque la exposición *in vitro* de células tumorales a este agente ha demostrado que induce la apoptosis, inhibe la proliferación y promueve la diferenciación [244], no solo en células de CCR sino también en células de cáncer de mama, estómago, pulmón, cerebro y páncreas [245]. El butirato de sodio es un inhibidor de la histona desacetilasa (HDAC) y ha mostrado cierta eficacia como fármaco antitumoral [246, 247]. Desafortunadamente, su uso clínico está limitado por su corta semivida plasmática, que se debe a su rápida metabolización a través del hígado y rápida excreción. Esto requiere una administración continua i.v. para mantener concentraciones terapéuticas, además de presentar múltiples efectos adversos (como anemia, cefaleas, náuseas, diarrea, calambres abdominales y dolor intenso.) empeorando la adherencia del paciente al tratamiento. Para resolver estos problemas, se encapsuló en SLPs un derivado del butirato en SLPs usando el método de microemulsión [248]. Fueron administradas en varias líneas tumorales, en unos pocos minutos mostraron un mayor efecto antineoplásico que el del butirato [83, 249]. Los resultados mostraron que el nanosistema sorprendentemente disminuía la adhesión de las líneas tumorales a las células endoteliales y la migración de células cancerosas.

Estudios farmacológicos con compuestos extraídos de plantas medicinales han recibido un gran interés por parte la comunidad científica durante décadas. Varias propiedades farmacológicas y biológicas han atraído la atención en el desarrollo de derivados sintéticos del éster del ácido gálico (GA) [250]. El GA y sus derivados han mostrado efectos citotóxi-

cos y antiproliferativos sobre tejidos y células [251] y también han demostrado que juegan un papel importante en la prevención de enfermedades inflamatorias [252]. Derivados del éster del GA también inhiben selectivamente la proliferación de procesos de metástasis y mostraron considerables efectos citotóxicos en una amplia variedad de tumores específicos de seres humanos y líneas de células tumorales murinas [253]. La ventaja de GA y sus derivados es su selectividad para inducir apoptosis en células cancerosas sin afectar a células no tumorales [253]. Entre sus derivados, el galato de tetradecilo mostró la capacidad de controlar la metástasis tumoral mediante un efecto inhibitor sobre la adhesión celular y sobre la permanencia de células tumorales dentro del tejido invadido [254]. Sin embargo, la aplicación terapéutica del GA es limitada, debido a sus inconvenientes farmacocinéticos. Estudios clínicos y preclínicos han mostrado las restricciones de uso del GA debido a su baja biodisponibilidad, mala absorción, rápida metabolización y eliminación del organismo [252]. Por este motivo ha sido un fármaco elegido para ser transportado en nanosistemas de administración de fármacos, en concreto, en las SLPs puede mejorar la administración parenteral de este fármaco y modular su farmacocinética. Para ello, en el trabajo de Cordova y cols. [255] se planteó desarrollar una nueva formulación con SLPs cargados con galato de octilo (G8) para evaluar los efectos tóxicos y la actividad antimetastásica en un modelo murino de melanoma preclínico. Los resultados mostraron que el tratamiento con SLPs cargadas con G8 en ratones con metástasis inducida disminuyeron la toxicidad del fármaco manteniendo el efecto antineoplásico.

Antineoplásicos frente al cáncer: doxorrubicina

De entre la diversidad de antineoplásicos que existen en el mercado se encuentra la doxorrubicina. Es un antibiótico perteneciente a la familia de las antraciclinas que actúa inhibiendo la biosíntesis macromolecular al intercalarse en las cadenas de ácido desoxirribonucleico (ADN) (Fig. 1.13). Otro de los mecanismos de acción se relaciona con la inhibición de la topoisomerasa II [256,257] .

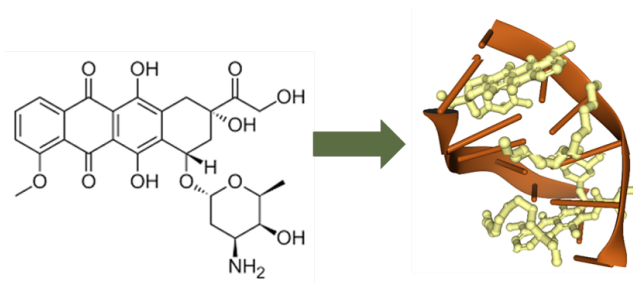


Figura 1.13: Estructura química de la doxorrubicina. Este fármaco intercalándose entre las cadenas de ADN.

La doxorrubicina es un fármaco antineoplásico de amplio espectro que ejerce su efecto citotóxico al actuar en la replicación, transcripción y fragmentación del ADN. Además, la doxorrubicina también ejerce un efecto citotóxico mediante estrés oxidativo que conduce a la apoptosis celular [258–260]. Está indicada en diferentes tumores sólidos (carcinoma de mama, carcinoma microcítico de pulmón, carcinoma gástrico y tumores ginecológicos, entre otros), tumores hematológicos (linfomas, leucemias y mieloma múltiple), sarcomas y tumores sólidos pediátricos. En las dosis habitualmente empleadas en clínica,

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

la doxorubicina presenta una farmacocinética lineal con una amplia distribución a tejidos periféricos que le confiere un volumen de distribución alto a pesar de su unión elevada a proteínas plasmáticas, principalmente a la albúmina. La doxorubicina no atraviesa la barrera hematoencefálica, pero sí la placenta, y es metabolizada ampliamente en el hígado por la enzima aldoketo reductasa que origina su metabolito principal, el doxorubicinol. También, aunque en menor medida, la doxorubicina es sustrato de la isoforma 3A4 del citocromo P450 y el metabolito que origina es la doxorubicina-7-desoxiaglicona. El doxorubicinol tiene aproximadamente el 10 % de la actividad de doxorubicina, y junto con el metabolito 7-desoxiaglicona son los principales responsables de la toxicidad de este fármaco [261–263].

Entre los principales efectos adversos que limitan el empleo de la doxorubicina en su uso en clínica se encuentran la toxicidad hematológica y la cardíaca aunque también se han documentado otras toxicidades como hepática, renal, gastrointestinal y dermatológica [261–263]. El efecto cardiotoxico se produce por la síntesis y acumulación de sus metabolitos en los cardiomiocitos. Algunos estudios *in vitro* mostraron que el doxorubicinol inhibe la contractilidad del músculo cardíaco de ratón entre 10 y 30 veces más que la doxorubicina [264]. El desarrollo de cardiotoxicidad crónica está relacionada con la concentración plasmática máxima ($C_{m\acute{a}x}$) de doxorubicina. Por lo que, este efecto adverso puede reducirse significativamente modificando su administración. Este tipo de toxicidad también está relacionada con una acumulación de dosis altas. La monitorización de las concentraciones plasmáticas de doxorubicina se justifica principalmente por tres razones:

1. Presenta un margen terapéutico estrecho.
2. Presenta una farmacocinética muy variable.
3. Existe correlación entre sus concentraciones en plasma, su eficacia y, en consecuencia, la aparición de efectos adversos [264, 265].

Las características farmacocinéticas y farmacodinámicas de la doxorubicina justifican la monitorización de sus concentraciones plasmáticas, aunque su implementación rutinaria en la práctica clínica es escasa debido a la necesidad de disponer de una técnica analítica que presente una adecuada precisión, exactitud, especificidad y selectividad para la determinación de doxorubicina en muestras biológicas de pacientes. Por estos motivos, este fármaco se muestra como un buen candidato para ser vehiculizado en nanotransportadores de fármacos.

1.6.4. Doxorubicina encapsulada en nanotransportadores lipídicos

Se han propuesto varios enfoques para disminuir la toxicidad, como administrar la doxorubicina simultáneamente con el agente cardioprotector dexrazoxano. La cardiotoxicidad se puede minimizar con el uso de un sistema de administración basado en un nanosistema que pueda modular la distribución farmacológica, reduciendo finalmente su acumulación en el corazón. Liposomas cargados con doxorubicina [266] han mostrado un mayor índice terapéutico, mayor tiempo en la circulación, [267], menos cardiotoxicidad, alopecia y neutropenia [268]. Además de los liposomas, la doxorubicina ha sido

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

incorporada en dendrímeros, partículas poliméricas, nanocristales, nanogeles, nanotubos, y nanoemulsiones [269–271].

Varias nanomedicinas anticancerígenas liposomales pegiladas y no pegiladas están en el mercado tras su aprobación por la FDA (Tabla 1.8). Muchas se encuentran en etapas de ensayos clínicos. Uno de los medicamentos aprobados es el Doxil® que fue aprobado en 1995 para cáncer de mama y cáncer de ovario (Tabla 1.8). El Doxil® es una bicapa lipídica pegilada de fosfatidilcolina y colesterol. La doxorrubicina liposomal mostró una vida media de circulación prolongada en comparación con el fármaco convencional al evitar su captación por el sistema reticuloendotelial. Caelyx®, Evacet® y Lipodox® también son nanomedicinas basadas en liposomas [272]. Otro medicamento aprobado por la FDA Myocet® fue comercializado en Europa y Canadá en el año 2000 y ThermoDox® presenta la particularidad de ser sensible a la temperatura. Está indicado en el tratamiento del cáncer de hígado y se encuentra en fase III de ensayo clínico.

Tabla 1.8: Formulaciones liposomales cargadas con doxorrubicina de uso clínico.

Nombre	Componentes de la formulación	Indicaciones	Comercialización (Año)
Doxil®	Liposoma (PEG); Doxorrubicina	Cáncer de mama/ovario	1995
Myocet®	Liposoma convencional; Doxorrubicina	Cáncer de mama	2000
ThermoDox®	Doxorrubicina	Carcinoma hepatocelular	Fase III E.C.

Estas formulaciones de doxorrubicina liposomal (Doxil®, Caelyx® y Myocet®) son una forma encapsulada de doxorrubicina, con un perfil farmacocinético mejorado y la capacidad de acumularse selectivamente en el tejido tumoral. Como resultado, se puede aumentar la dosis tolerada del fármaco, seguida de una menor incidencia de neutropenia y cardiotoxicidad en comparación con el tratamiento con doxorrubicina libre. Sin embargo, el efecto adverso común que limita la pauta posológica de tratamiento es el síndrome de eritrodisestesia palmoplantar [273]. Este efecto secundario es una reacción tóxica distintiva y relativamente común asociada con algunos agentes quimioterápicos. La doxorrubicina, citarabina, docetaxel y fluorouracilo son los agentes implicados con mayor frecuencia. Este síndrome parece depender de la dosis y su aparición está determinada tanto por la concentración máxima del fármaco como por la dosis acumulada total. La retirada o reducción de la dosis del fármaco implicado suele conducir a una mejoría de los síntomas [274]. Por este motivo se generaron nuevas alternativas en la encapsulación de doxorrubicina empleando otros nanosistemas lipídicos como las SLPs, ya que la fracción lipídica de estas partículas puede mejorar significativamente la carga del fármaco y generar formulaciones con una estabilidad superior. Además de que, como se ha explicado previamente, estas SLPs permiten una alta retención del fármaco en la matriz, lo que desencadena una liberación sostenida del fármaco tras la llegada del tejido diana [273], reduciendo significativamente los posibles efectos adversos del fármaco notificadas el caso de las formulaciones liposomales aprobadas por la FDA. Existen algunos estudios en los que la doxorrubicina ha sido encapsulada en SLPs. Se desarrollaron SLPs cargadas con ácido docosaheptaenoico y doxorrubicina (Tabla 1.9). Las partículas mostraron una

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

eficiencia de encapsulación de casi el 100 % y una mejora de la actividad antitumoral en comparación con la doxorubicina libre y el ácido docosahexaenoico en ensayos *in vitro* [275]. En esta Tesis Doctoral se va a estudiar la eficacia terapéutica de la doxorubicina encapsulada en SLPs frente al tratamiento del cáncer metastásico.

Tabla 1.9: Formulaciones lipídicas cargadas con doxorubicina.

Nanosistema	Métodos de síntesis	Tamaño (nm)	E.E. (%)	Tipo de ensayo	Ref.
Nanopartículas sólidas	Fusión	50	100	<i>In vitro</i>	[275]
	Homogeneización (calor)				
	Emulsificación difusión (con disolvente)	199	67,5	<i>In vitro</i>	[276]
Nanoemulsión	Homogeneización a altas presiones	208,5	93,7	<i>In vivo</i>	[277]
	Homogeneización a altas presiones	104	84,2	<i>In vivo</i>	[278]
	Homogeneización	56	75,2	<i>In vivo</i>	[279]
Nanoesferas sólidas	Microemulsión	80	5	<i>In vivo</i>	[280]
	Microemulsión	80	82	<i>In vitro</i>	[281]
Poliméricos híbridos	Ultrasonidos	290	76	<i>In vitro</i>	[282]
	Ultrasonidos	80	60-80	<i>In vivo</i>	[283]

1.7. Tratamiento de infecciones intracelulares empleando la Nanomedicina

Además del tratamiento contra el cáncer, la terapia antimicrobiana es otra área clínica que se está investigando intensamente para el desarrollo de nanosistemas de liberación de fármacos. De manera similar a las terapias antineoplásicas, el uso de agentes antimicrobianos está frecuentemente limitado por toxicidades sistémicas o por administración sistémica deficiente. Se han identificado muchos agentes potentes, pero tienen una utilidad clínica limitada debido a perfiles de toxicidad inaceptables [39]. Además, muchos organismos han desarrollado resistencia a terapias previamente efectivas. Esto ha generado una necesidad urgente de identificar agentes novedosos o sistemas de administración alternativos para los fármacos existentes. La Nanomedicina ha demostrado su potencial para abordar algunos de estos problemas. La formulación liposomal de anfotericina B ha cambiado drásticamente la forma en que se manejan clínicamente las infecciones fúngicas sistémicas y crónicas. La anfotericina es un potente fármaco antimicótico que se asocia con frecuencia con nefrotoxicidad clínicamente significativa y reacciones de hipersensibilidad extrema que no se alivian con la premedicación o la hidratación excesiva. La formulación liposomal de anfotericina B reduce significativamente la toxicidad sistémica y mejora sustancialmente su utilidad clínica en poblaciones de alto riesgo, como los pacientes con fibrosis quística [284]. La nanoformulación ha transformado la anfotericina, de un fármaco utilizado sólo por necesidad a uno que se encuentra habitualmente en la clínica. El potencial antimicrobiano de las nanomedicinas no se limita a los vectores de administración de

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

fármacos. Los materiales a nanoescala, incluidos nanosistemas inorgánicos, poliméricos y dendríticos, pueden diseñarse para que tengan una potente actividad antibiótica. Cientos de nanomedicamentos antimicrobianos se han sometido a evaluación preclínica y muchos de ellos han demostrado una actividad bactericida significativamente mejorada en las nanoformulaciones en comparación con los fármacos libres, en particular contra las cepas bacterianas resistentes y los *biofilms* [285,286]. Además de las fórmulas de los antibióticos existentes, las nanoformulaciones que contienen metales, también tienen una potente actividad antibiótica. Dada la gran cantidad de fórmulas candidatas, su éxito preclínico y la urgente necesidad de identificar agentes antimicrobianos mejorados, se espera que en los próximos años un número considerable de nanoformulaciones antimicrobianas estén en fase de ensayos clínicos [39] y algunos aprobados como el Arikayce® liposomal aprobado en el año 2020 para el tratamiento de la infección pulmonar causada por *Micobacterium avium*.

Las bacterias son causa de enfermedades tan conocidas como la tuberculosis, presente entre las 10 primeras causas de mortalidad en 2016, según los datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS). A principios del siglo XX, las enfermedades infecciosas eran la principal causa de mortalidad a nivel mundial, pero la aparición de los antibióticos, en 1928, marcó un antes y un después, reduciendo la tasa de mortalidad y alargando la esperanza de vida. Con el gran desarrollo de antibacterianos entre 1940 y 1960, se generó un gran optimismo hacia la erradicación de las enfermedades infecciosas, pero en los años 80, la industria farmacéutica declinó la investigación de antiinfecciosos, considerando que ya eran suficientes las moléculas existentes [287]. Sin embargo, la aparición de cepas bacterianas resistentes a las pautas antibióticas convencionales no han dejado de incrementarse hasta nuestros días y es que, desde su descubrimiento, los antibióticos se han usado de forma indiscriminada dando lugar a la actual situación de resistencias a antibióticos. Cuando se emplea un antimicrobiano a una dosis determinada, cumple su función bactericida o bacteriostática. Sin embargo, ciertas bacterias cuentan con mayor capacidad de resistencia por mutaciones genéticas aleatorias en el contexto de la evolución de las especies, por lo que conseguirán sobrevivir y formarán nuevas colonias con esa capacidad para resistir el efecto antibiótico. Es posible en ocasiones evitarlo aumentando la dosis del fármaco, sin embargo implica mayor toxicidad en el paciente. No se debe confundir esta situación con las resistencias naturales a antibióticos debido a la incapacidad de éstos para penetrar en mayor o menor grado en la estructura bacteriana y alcanzar su diana terapéutica o bien porque dicha diana no se encuentre presente en la bacteria. Algunos de estos mecanismos de resistencia en las bacterias son los que se muestran en la Figura 1.14 donde destacan, la alteración del lugar de acción del antibiótico, la degradación enzimática de éste, su alteración enzimática o las bombas de flujo que expulsan dicho fármaco al espacio extracelular.

A este aumento de resistencias al tratamiento se le ha sumado la paralización del mercado de nuevos antibióticos en los últimos años [288–290]. Existe una falta de interés por parte de la industria farmacéutica en el desarrollo de nuevos antibióticos, ya que son medicamentos cuyo empleo es temporal. Deben ser usados sólo en casos necesarios, así que es preciso buscar incentivos distintos para estimular el desarrollo de antibióticos nuevos. Además, los antimicrobianos no sólo son complejos de desarrollar, los nuevos productos no pueden ser vendidos como otros medicamentos. Las posibles nuevas moléculas que pueden surgir en el mercado deben colocarse en reserva para los casos más graves, por lo que esto no presenta una oportunidad de inversión atractiva (Organización Mundial de la Salud, OMS). Aunque existen antibióticos en fase de desarrollo por la industria farmacéutica,

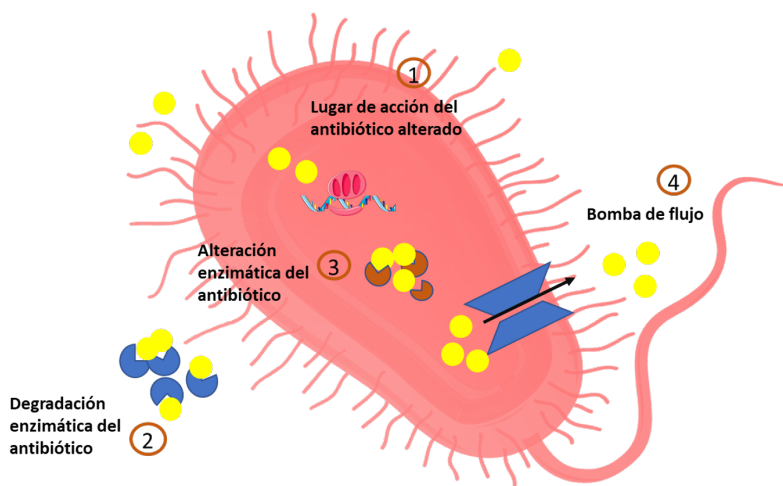


Figura 1.14: Mecanismos de resistencias de las bacterias al tratamiento con antibióticos.

actualmente, no se prevé que presenten eficacia contra las bacterias más resistentes. La gran magnitud de este problema en el tratamiento de algunas infecciones, llevó a la OMS a aprobar un plan de acción mundial sobre la resistencia a antimicrobianos en 2015. Este mismo organismo (OMS), indicó que el avance en nuevas moléculas es más innovador, con 252 agentes en investigación básica en 2017, pero estas nuevas moléculas aún no se han sometido a pruebas de seguridad o eficacia y tardarán, según la entidad, al menos diez años en llegar al mercado, si demuestran ser viables. Entre los años 2018 y 2019, 9 fármacos antibacterianos o una combinación de ellos fueron aprobados. A fines de 2019, un total de 42 nuevos antibióticos o nuevas combinaciones se encuentran en diferentes etapas de desarrollo clínico a nivel mundial [291].

1.7.1. Bacterias intracelulares

Dentro de la diversidad de bacterias que existen, hay bacterias que presentan la peculiaridad de habitar intracelularmente. Un ejemplo de ello es el género *Listeria spp.*. Estas bacterias intracelulares pueden habitar y replicarse en el interior de las células del sistema inmune. Estas células son conocidas como células fagocíticas (monocitos, neutrófilos y macrófagos) y son las encargadas de captar y eliminar a los microorganismos patógenos y deshacerse de los tejidos dañados. Los neutrófilos y los macrófagos reconocen de forma específica los microbios en el lugar de infección, los fagocitan y posteriormente son ubicados en una vesícula en el citoplasma de los fagocitos denominada fagosoma. El fagosoma se fusiona con los lisosomas, que contienen enzimas proteolíticas, donde además se producen especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico que cumplen una función microbicida. Las bacterias intracelulares, sin embargo, han logrado desarrollar diferentes mecanismos para evadir la respuesta inmune innata. Entre éstas se encuentra el escape de los fagosomas hacia el citoplasma celular, el bloqueo de la fusión de los lisosomas con los fagosomas o su resistencia a las moléculas microbicidas del interior del fagolisosoma [292]. Con estas estrategias son capaces de persistir largos periodos de tiempo. En los últimos años, algunos estudios han desvelado como patógenos, clásicamente extracelulares, han desarrollado mecanismos para invadir y sobrevivir en el interior celular, evadiendo la

acción del sistema inmune y, en consecuencia, la complicación que implica un tratamiento eficaz frente a estas infecciones en el paciente. Algunos de ellos pertenecen al grupo conocido por el acrónimo ESKAPE. Se trata de una agrupación de especies bacterianas muy letales, con gran facilidad y rapidez para desarrollar mecanismos de resistencia a fármacos (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Enterobacter spp.*) [293, 294].

Los patógenos ESKAPE son responsables de la mayoría de las infecciones nosocomiales y son capaces de “escapar” de la acción biocida de los agentes antimicrobianos [295]. La OMS también ha incluido recientemente los patógenos ESKAPE en la lista de 12 bacterias contra las que se necesitan con urgencia nuevos antibióticos [296]. Describen tres categorías de patógenos, de prioridad crítica, alta y media, de acuerdo con la urgencia de la necesidad de nuevos antibióticos. *A. baumannii* y *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos junto con β -lactamasa de amplio espectro o *K. pneumoniae* y *Enterobacter spp.* resistentes a carbapenémicos están incluidos en la lista de prioridad crítica de patógenos; mientras que *E. faecium* resistente a vancomicina y *S. aureus* resistente a meticilina y vancomicina están en la lista del grupo de alta prioridad. Los mecanismos de resistencia a múltiples fármacos exhibidos por el grupo de estos microorganismos ESKAPE se agrupan ampliamente en tres categorías, inactivación enzimática del fármaco, modificación de la diana del fármaco o acumulación reducida del mismo debido a una permeabilidad reducida o por aumento de la salida del fármaco [293]. Con cada año que pasa, la cantidad total de antibióticos efectivos contra ESKAPE está disminuyendo, lo que nos predispone a un futuro con antibióticos que sean ineficaces. El análisis de las listas de antibióticos recomendadas en las pautas del *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI) reveló que muchos antibióticos sugeridos contra ESKAPE desde 2010 se han eliminado con la adición de relativamente pocas combinaciones de antibióticos. Además, se han notificado incidencias de resistencia contra algunos de estos antibióticos recién añadidos. Por lo tanto, es imperativo encontrar formas alternativas de tratar las infecciones, especialmente las causadas por patógenos ESKAPE. Las terapias alternativas que se encuentran actualmente en práctica o en ensayos incluyen el uso de antibióticos en combinación o con adyuvantes, terapia con bacteriófagos, uso de péptidos antimicrobianos, terapia fotodinámica, anticuerpos antibacterianos, fitoquímicos y nanopartículas como agentes antibacterianos [297]. Aunque muchas de estas terapias alternativas reportadas han mostrado resultados prometedores *in vitro*, su eficacia cuando se aplican *in vivo* puede no ser la misma debido a una o varias limitaciones. Por tanto, es necesario comprender la acción de estos agentes terapéuticos *in vivo*.

1.7.2. Tratamiento actual frente a microorganismos intracelulares. Problemas de eficacia

Respecto a las infecciones causadas por patógenos intracelulares, el tratamiento antibiótico está más limitado debido a la localización de las bacterias. Algunos factores que influyen en el objetivo del tratamiento son: la penetración celular, la acumulación citoplasmática del fármaco, la distribución subcelular, la biodisponibilidad del mismo, el metabolismo o inactivación del fármaco, así como la sensibilidad bacteriana. En conclusión, son necesarias moléculas que atraviesen la membrana citoplasmática, y además que sean capaces de permanecer en esta ubicación alcanzando una concentración superior a la concentración mínima inhibitoria (CMI), que se refiere a la cantidad mínima de antibiótico

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

capaz de inhibir el crecimiento bacteriano. Antibióticos con características hidrofílicas como los aminoglucósidos o los beta-lactámicos tienen una pobre penetración intracelular debido a la poca afinidad que presentan con las membranas celulares, de naturaleza lipófila (Fig. 1.15). Por otro lado, otros grupos farmacológicos como las fluoroquinolonas o los macrólidos sí difunden al interior, pero no son retenidos, por lo que la concentración de fármaco no siempre es la adecuada para la erradicación de la bacteria. Además, la distribución subcelular de los diferentes antibióticos no es uniforme y factores como el pH o la presencia de enzimas pueden modificar la actividad antibacteriana. Por tanto, todo ello conduce a que las concentraciones intracelulares de los antibióticos en muchas ocasiones sean subterapéuticas [292, 298]. Este hecho provoca, en muchos casos, un aumento de la dosis del antimicrobiano para contrarrestar esto, pero ese aumento en antibacterianos inespecíficos, con características farmacocinéticas inadecuadas y una amplia distribución, provocan la aparición de efectos secundarios en el paciente.

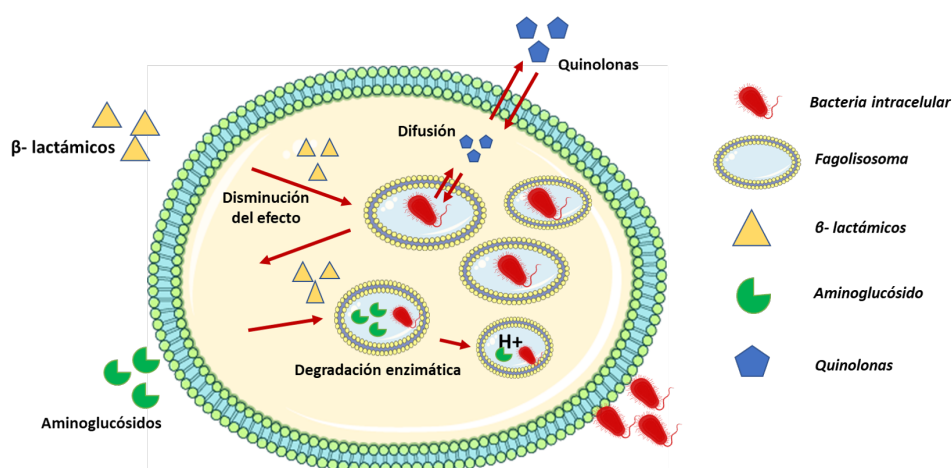


Figura 1.15: Inconvenientes de la eficacia terapéutica de los antibióticos frente a infecciones intracelulares.

Elevar las dosis de los antibióticos o administrarlos por vía parenteral pueden ser dos estrategias para aumentar la biodisponibilidad y alcanzar una mayor concentración. Sin embargo, existe un mayor riesgo de aparición de efectos adversos en los pacientes, por ejemplo aparición de ototoxicidad o nefrotoxicidad en el caso de emplear aminoglucósidos. Por otro lado, los tratamientos combinados con varios fármacos o periodos de tratamiento largos se consideran factores que disminuyen la adherencia por parte de los pacientes [299]. Un mal cumplimiento terapéutico o la imposibilidad para alcanzar una dosis terapéutica favorece la aparición de nuevas resistencias frente a los antibióticos.

Las bacterias adquieren genes de resistencia a través de mutaciones puntuales espontáneas, en un ambiente expuesto al antibiótico en cuestión, expresan dicho gen mutado, logrando sobrevivir, mientras que el resto de las bacterias sin dicho gen son eliminadas. Posteriormente, será esta bacteria con el gen de resistencia en su información genética quien se reproduzca y transmita el gen horizontalmente o verticalmente, ya resistente al antibiótico en cuestión. Por tanto, además de una bacteria con una localización poco accesible, encontramos problemas de sensibilidad a los fármacos empleados. Un ejemplo que ilustra la dificultad en acabar con el agente patógeno intracelular de una infección es el caso de *Mycobacterium tuberculosis* y el creciente número de cepas

resistentes al tratamiento que están apareciendo [115, 300]. El tratamiento antibiótico usual implica que, tras la absorción intestinal, el principio activo alcance células hepáticas o esplénicas a través de la sangre de forma más abundante en comparación con los macrófagos alveolares en caso de infección pulmonar tuberculosa, por lo que la eficacia terapéutica es menor en este caso. Los fármacos empleados en primer lugar son: isoniazida, rifampicina, etambutol, pirazinamida y estreptomicina. El efecto farmacológico es bactericida para este organismo cuando se encuentra multiplicándose, es decir, el antibiótico erradica la bacteria. No obstante, la división de *M. tuberculosis* es escasa en el ambiente intracelular del macrófago, debido a ser pobre en oxígeno y de pH ácido. La pauta más extendida con el objetivo de un tratamiento curativo dura al menos 6 meses, un periodo prolongado necesario para erradicar las micobacterias y evitar la aparición de cepas resistentes. El número de enfermos debido a cepas resistentes es cada vez mayor, siendo la resistencia a isoniazida la más frecuente, en torno a un 10 % de los casos. Ante la dificultad que supone tratar las infecciones ocasionadas por los organismos intracelulares, tanto por la localización escasamente accesible como por el incremento de estrategias adquiridas por las bacterias que reducen su sensibilidad a los antibióticos, se han estudiado y desarrollado nuevas alternativas terapéuticas como la aplicación de la Nanotecnología en el tratamiento de dichas infecciones.

1.7.3. Nanosistemas frente a infecciones intracelulares: “Nanoantibióticos”

Los nanosistemas transportadores de antibióticos o también llamados nanoantibióticos pueden actuar frente a las bacterias, por un lado encapsulando un fármaco con actividad bactericida y por otro, pueden presentar actividad antimicrobiana intrínseca.

Nanosistemas con actividad antimicrobiana intrínseca

Estos nanomateriales consisten en metales u óxidos de metales, basados en carbono o nanoemulsiones cuya actividad bactericida puede ser debida a [301]:

1. Producción fotocatalítica de especies reactivas de oxígeno (ROS).
2. Alteración de la pared o de la membrana celular.
3. Interrupción del metabolismo energético de la bacteria.
4. Inhibición de la actividad enzimática o de la síntesis de ADN.
5. Inhibición de la síntesis de la pared bacteriana.

Unos de los nanosistemas empleados para el tratamiento de enfermedades intracelulares han sido los dendrímeros, ya que el propio esqueleto central del dendrímero ha sido estudiado y usado en ocasiones como agente antimicrobiano intrínseco, destruyendo directamente la membrana de los patógenos bacterianos o impidiendo las interacciones entre estos patógenos con las células del organismo [301]. También se han diseñado formulaciones de dendrímeros monosilados que contienen rifampicina, mostrando una

liberación pH dependiente en el interior de los macrófagos alveolares [302]. Los *quantum dots* también han mostrado eficacia frente a infecciones intracelulares [303]. Por otro lado, las nanopartículas de plata han demostrado eficacia en el tratamiento antimicrobiano mejorándolo respecto al antibiótico convencional, pero en su caso no como transportadores ya que por sí mismas presentan efecto antimicrobiano. Es el caso del estudio de Dong y cols, [304], donde se observa este efecto antimicrobiano propio de estas nanopartículas de plata, se observó que las nanopartículas de un tamaño de 10 nm fueron las que mejor efecto terapéutico presentaron.

Nanosistemas como transportadores de fármacos antimicrobianos

Los nanosistemas transportadores de antibióticos deben reunir las características ya mencionadas a lo largo de este trabajo como son: especificidad al lugar de acción, liberación controlada, biocompatibilidad y disminución de la toxicidad entre otras [305]. De entre los nanosistemas que pueden emplearse en la vehiculización de fármacos, los que van a explicarse a continuación son los que más se han empleado en estudios previos con el fin de mejorar el tratamiento actual frente a las infecciones intracelulares. Estos nanotransportadores pueden vehiculizar el fármaco mediante un transporte activo y pasivo. El mecanismo pasivo por el que los nanotransportadores acceden al lugar de infección está basado en la inflamación [299]. La presencia de componentes bacterianos estimula a moléculas mediadoras de la inflamación, activando a células inmunes que interactúan con células endoteliales. Todo ello favorece un medio inflamatorio con aumento de la vascularización local e incremento de la permeabilidad de los vasos [292, 306]. En este contexto se facilita que las nanopartículas administradas por vía intravenosa accedan al foco infeccioso y puedan ser internalizadas por las células del RES. Los mismos mecanismos de fagocitosis de patógenos pueden utilizarse por las nanopartículas para liberar fármacos en el interior celular. Además, la disfunción del drenaje linfático en la zona puede contribuir a la retención y acumulación de las mismas [306]. Uno de estos nanosistemas empleados en la encapsulación de antibióticos son las nanopartículas poliméricas. En estas partículas se emplea la conjugación de los fármacos de forma covalente a la matriz de estos nanomateriales para transportarlos en su interior conjuntamente. Las técnicas de emulsión permiten coencapsular sustancias hidrofílicas e hidrofóbicas. En estudios *in vitro* de nanopartículas de ácido poli (láctico-co-glicólico) (PLGA) frente a infección por *Brucella spp.* se demostró una reducción en el número de bacterias intracelulares. Sin embargo, no tuvieron actividad terapéutica *in vivo* ya que presentaron tendencia a la agregación y no fueron capaces de alcanzar la diana farmacológica [307]. Otros estudios de nanopartículas poliméricas encapsulando ampicilina, han arrojado buenos resultados reduciendo la mortalidad por infecciones agudas en ratones provocadas por *Salmonella typhimurium* [308]. El estudio muestra como para lograr el mismo efecto, es necesario triplicar la dosis de ampicilina libre administrada en comparación con la utilizada por estas nanopartículas. La ampicilina también se ha testado encapsulada en nanopartículas poliméricas en ratones infectados por *Listeria spp.* Se obtuvieron mejores resultados de nuevo, en comparación con la administración de este antibiótico en solución, además de necesitar una dosis menor [307]. Este sistema mostró la completa erradicación de la infección en el hígado de los ratones con siete días de tratamiento, en cambio, en el caso del bazo no se encontraron resultados significativos, aunque sí se apreció una disminución de la infección empleando estas nanopartículas en comparación con los ratones no tratados. Las nanopartículas de sílice mesoporosa cargadas con moxifloxacino o con rifampicina

mostraron resultados mejorados respecto al fármaco en solución [309].

Otros estudios han mostrado que una combinación de nanopartículas de plata (con actividad intrínseca) y un antibiótico puede inhibir sinérgicamente el crecimiento bacteriano, especialmente contra la bacteria *Salmonella typhimurium* [310].

1.7.4. Nanotransportadores basados en lípidos frente a infecciones intracelulares

Como ya se ha comentado en el punto anterior, son muchos los nanosistemas que se han estudiado y que han mostrado eficacia frente a bacterias intracelulares, pero los que más se han empleado y de los que más estudios hay documentados son de los nanosistemas con base lipídica. Más concretamente en el transporte de antibióticos son dos los más destacados: Los liposomas y las partículas sólidas lipídicas. Los liposomas han sido formulados para encapsular antibiótico y controlar su liberación mediante estímulos como un cambio de pH del medio o con activación mediante toxinas liberadas por las propias bacterias al medio. Los liposomas presentan una ventaja en el tratamiento de infecciones intracelulares frente a otros nanosistemas y es que cuando los liposomas son administrados por vía parenteral son captados por los macrófagos como parte del RES y son estas células, precisamente, la diana farmacológica de los antibióticos transportados, ya que actúan como células huésped de bacterias intracelulares. Los liposomas han demostrado ser útiles en la liberación intracelular de aminoglucósidos y fluoroquinolonas en el tratamiento de infecciones intracelulares. También han mostrado ser efectivas liberando claritromicina y azitromicina en macrófagos infectados por *Mycobacterium avium* [292]. En el tratamiento de brucelosis, liposomas catiónicos [302] con gentamicina lograron una elevada tasa de eliminación bacteriana intracelular. En estudios posteriores *in vivo* en ratones infectados con *Brucella abortus*, se observó además un efecto protector muy significativo [302]. Los liposomas cargados con ampicilina son otra posible opción frente a salmonelosis. Estos liposomas han demostrado ser un tratamiento más eficaz que la administración de estos mismos fármacos de forma convencional y han conseguido reducir la toxicidad [311]. Por otro lado, liposomas con ciprofloxacino también han evidenciado ser mejor opción que administrar este antibiótico de forma libre, ya que su concentración plasmática y en los diferentes órganos afectados es mayor, y el número de bacterias que permanecen en el hígado y bazo de los ratones estudiados fue menor [311]. En estudios con ratones infectados por *Listeria spp.*, se han comparado dos pautas de tratamiento con ampicilina, una administración libre del antibiótico y otra administración mediante liposomas. Esta última ha logrado mejores resultados en la reducción de la enfermedad, disminuyendo la supervivencia de *Listeria monocytogenes* en los macrófagos peritoneales [302]. Además, se ha observado que la composición de los liposomas influye en su objetivo, ya que aquellos liposomas con una estructura menos fluida debido a los componentes que lo conforman, son capaces de mantener una mayor concentración de ampicilina durante un tiempo más prolongado en el organismo, en comparación con otros liposomas que presentan una estructura más fluida.

En el caso de las partículas sólidas lipídicas se han investigado como transportadores en el tratamiento de la tuberculosis, empleando los fármacos rifampicina, isoniazida y

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

pirazinamida. Resultando que, independientemente de la vía de administración, tras 7 días de tratamiento y con una administración de 5 dosis, no se detectaban bacilos en el pulmón y en el bazo, respectivamente [292]. En el caso de *Listeria spp.*, Trinetta y cols. estudiaron el empleo de partículas sólidas lipídicas cargadas con limoneno, una sustancia natural procedente de las cáscaras de los cítricos, empleado como antibacteriano. Para ello, se emplearon varias suspensiones microbianas de *L. monocytogenes* donde se observó que el limoneno cargado en estas partículas era aún más efectivo que en su forma libre [312]. En esta Tesis Doctoral se van a encapsular dos antimicrobianos, el cloranfenicol y la enrofloxacin, por lo que a continuación se detallarán más en profundidad dichos fármacos.

1.7.5. Antimicrobianos encapsulados: cloranfenicol

El cloranfenicol se aisló originalmente de *Streptomyces venezuelae*, aunque actualmente es sintético. Actúa inhibiendo la síntesis de proteínas en organismos susceptibles, al competir con el ARNm por los sitios de unión en el ribosoma, necesarios para la formación de enlaces peptídicos. El cloranfenicol se une de manera reversible a la subunidad 50S del ribosoma 70S, lo que evita la unión del extremo del aminoacil-ARNt que contiene aminoácidos a su región de unión, inhibiendo así la peptidil transferasa (Fig. 1.16). Este mecanismo de acción suele ser bacteriostático, aunque el cloranfenicol es bactericida contra las tres causas más comunes de meningitis en niños: *H. influenzae*, *S. pneumoniae* y *N. meningitidis*. El espectro de actividad del cloranfenicol incluye bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, anaerobios, espiroquetas y los géneros *Rickettsia spp.*, *Chlamidia spp.* y *Mycoplasma spp* [313].

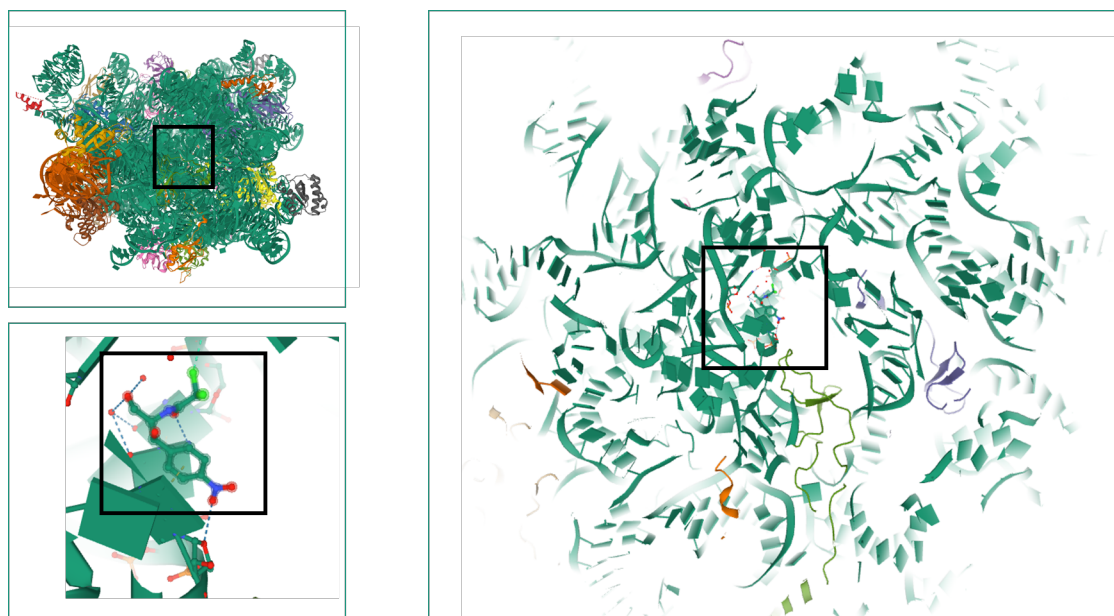


Figura 1.16: Complejo formado por la unión del cloranfenicol a la subunidad 50s del ribosoma [314].

El cloranfenicol fue el tratamiento de elección para la fiebre tifoidea. Sin embargo, debido a la disponibilidad ilimitada de cloranfenicol sin receta en muchas partes del mundo, la bacteria *Salmonella typhi* ha desarrollado resistencia. También se ha informado resistencia al cloranfenicol en otros organismos previamente susceptibles, incluidos *Shigella spp.* y *H. influenzae*. Las bacterias se vuelven resistentes al cloranfenicol al hacerse

impermeables al fármaco o al producir una enzima inactivante del mismo, la cloranfenicol acetiltransferasa. Este último mecanismo está mediado por plásmidos, lo cual es importante por la posibilidad de aparición de resistencias cruzadas a otros antimicrobianos, como los aminoglucósidos y las tetraciclinas [313].

El cloranfenicol está disponible para uso sistémico en forma de cápsulas, suspensión oral y formulación parenteral. Deben medirse las concentraciones séricas de cloranfenicol para controlar los niveles seguros y eficaces del fármaco. Las concentraciones séricas máximas de cloranfenicol generalmente se alcanzan en 30 minutos después de completar una infusión intravenosa o 90 minutos después de la administración oral, y deben mantenerse dentro del rango de seguridad para asegurar un nivel terapéutico adecuado y evitar la toxicidad. Los niveles séricos deben obtenerse después de dos o tres dosis y controlarse semanalmente o con mayor frecuencia si está clínicamente indicado. El cloranfenicol se difunde bien en muchos tejidos y líquidos corporales, alcanzando niveles en el líquido cefalorraquídeo que son aproximadamente del 30 al 50 % de las concentraciones séricas. Esto es mayor que los niveles alcanzados por otros antibióticos y posiblemente se deba al pequeño tamaño molecular del fármaco y su alto grado de solubilidad en lípidos y baja afinidad de unión a proteínas [315].

En cuanto a las reacciones adversas que produce el cloranfenicol, la supresión de la médula ósea es la más importante y puede ocurrir por dos mecanismos muy distintos. El primer mecanismo y más común es una supresión de la médula ósea relacionada con la dosis asociada a niveles elevados, que generalmente ocurre después de un mínimo de 7 días de tratamiento. Es el resultado de la inhibición de la síntesis de proteínas mitocondriales y se caracteriza por la vacuolización citoplásmica de precursores eritroides y mieloides tempranos en la médula ósea. Los efectos adversos incluyen anemia, leucopenia, trombocitopenia, disminución del recuento de reticulocitos y aumento de la concentración de hierro sérico. Dichos efectos son reversibles cuando se suspende el tratamiento. El segundo mecanismo es una anemia aplásica idiosincrásica irreversible [316]. El cloranfenicol ya no es el fármaco de elección para ninguna infección específica, pero puede considerarse un tratamiento alternativo en infecciones graves como la meningitis en pacientes alérgicos a la penicilina o si hay presencia de *S. pneumoniae* resistente a cefalosporinas. Otras posibles indicaciones incluyen el uso como agente oral para la meningitis bacteriana o para la fiebre tifoidea en países en desarrollo, donde no se dispone de terapia parenteral. Como sucedió con la vancomicina, el cloranfenicol puede convertirse en un agente importante en el tratamiento de organismos multirresistentes. Los nuevos agentes desarrollados para tratar infecciones Gram-positivas resistentes, como quinupristina, dalfopristina y linezolid, ya se han asociado con la aparición de resistencias [315].

1.7.6. Cloranfenicol encapsulado en nanotransportadores de fármacos frente a infecciones intracelulares

El cloranfenicol ha sido transportado en diversos nanosistemas según han documentado diversos estudios. Uno de los nanosistemas han sido los liposomas. Cuando el cloranfenicol ha ido transportado en liposomas ha mejorado su efecto antibacteriano cuando fueron administrados por vía tópica, debido a su liberación controlada en el tiempo y a

su capacidad para atravesar la piel por su naturaleza lipofílica. Esta liberación controlada también mejoró el efecto del cloranfenicol en liposomas en la acción bactericida frente a *biofilms* [317]. Otros trabajos han combinado en un nanosistema, nanopartículas de plata, que ya presentan efecto antibacteriano, con el cloranfenicol y los resultados fueron satisfactorios ya que el efecto sinérgico mejoró la respuesta antibacteriana frente a los componentes por separado [318]. Las nanopartículas de sílice mesoporosa también se han estudiado como nanovehiculizadores del cloranfenicol, en un estudio se mostró una encapsulación del 50 % y una liberación del fármaco controlada en el tiempo [319].

1.7.7. Antimicrobianos encapsulados: enrofloxacin

Las fluoroquinolonas son fármacos antimicrobianos bactericidas con excelente actividad frente a un amplio espectro de bacterias aerobias y contra micoplasmas. Debido a su bajo porcentaje de unión a proteínas plasmáticas tienen volúmenes de distribución elevados y presentan buena penetración en células y tejidos. Son útiles en el tratamiento de infecciones del aparato respiratorio y tejidos blandos. En numerosas especies de bacterias, las fluoroquinolonas dañan el ADN, provocando alteraciones en el superenrollamiento negativo [320]. Este efecto es debido a la inhibición de la actividad de la ADN-girasa (Fig. 1.17). La topoisomerasa IV es otro lugar de acción de las fluoroquinolonas. Los efectos tóxicos aparecen por la formación de un complejo irreversible formado por quinolona, girasa y ADN [320]. La inhibición de las topoisomerasas tipo II se produce de forma selectiva tanto en topoisomerasas microbianas como en topoisomerasas eucariotas de origen procariota en concentraciones bajas e incluso en las topoisomerasas de mamíferos en concentraciones más altas. Este amplio espectro de acción permite que este fármaco no solo tenga acciones antimicrobianas sino también antifúngicas y antiparasitarias [321,322]. Este complejo evita la progresión de la horquilla de replicación y complejos de transcripción, conduciendo a la fragmentación del cromosoma y a la muerte celular. La hidrofobicidad de estas moléculas promueve su absorción por difusión pasiva, pero los mecanismos de difusión no pasiva pueden influir también en la absorción intestinal [323,324]. El transporte mediado por transportadores a través de la membrana apical del intestino en ensayos *in vivo* en ratas fue demostrado con esparfloxacino, levofloxacino, ciprofloxacino y norfloxacino [324]. Es muy importante en este proceso que el fármaco esté completamente disuelto para que sea absorbido en los segmentos intestinales. Si no ocurre así, la biodisponibilidad oral será pobre y las concentraciones plasmáticas menores de las esperadas. También puede ocurrir una saturación de estos transportadores y el establecimiento de un proceso de competición por otras moléculas. Este sistema de transportadores puede ser un importante mecanismo en la eliminación de quinolonas, debido a la secreción activa de fármaco desde la sangre al lumen intestinal.

La relación entre farmacocinética y la actividad microbiológica (farmacodinámica) de las fluoroquinolonas permite determinar la dosis necesaria para lograr el resultado clínico deseado. Las quinolonas son antibióticos concentración- dependientes [325], cuanto mayor es la concentración en contacto con esas bacterias, mayor será su efecto, pero también su toxicidad debido a su acción no solo frente a la topoisomerasas procariota sino también frente a las eucariotas [321].

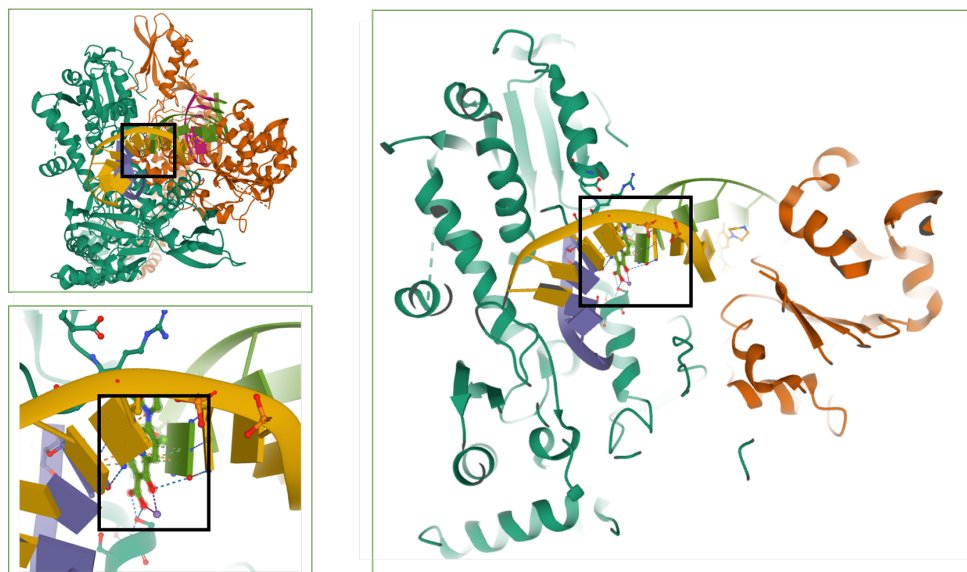


Figura 1.17: Unión del ciprofloxacino (metabolito de la enrofloxacina) a la ADN-girasa [326].

La toxicidad de una fluoroquinolona depende de la dosis y la especie de animal de destino [327]. En clínica, han sido descritas reacciones de fotosensibilidad, interacciones medicamentosas, efectos sobre el sistema nervioso central (ataxia, crisis epiléptica, desvanecimiento, insomnio, somnolencia y temores) y cristaluria (conduciendo a una uropatía obstructiva). Además, en Veterinaria, donde más se emplea este antibiótico, se han descrito alteraciones gastrointestinales (como náuseas, vómitos y diarrea), artropatías en animales jóvenes y toxicidad ocular (degeneración retiniana en gatos y cataratas subcapsulares). Algunas fluoroquinolonas inducen una prolongación del intervalo QT. Dicho intervalo es la medida del tiempo entre el comienzo de la onda Q y el final de la onda T en un electrocardiograma. Si se encuentra anormalmente prolongado puede generar arritmias ventriculares, por lo que en personas sensibles y, en personas con alto riesgo, este fármaco pueden provocar arritmias. Similarmente, ha sido descrito una prolongación de este intervalo en perros, tras la administración de altas dosis de fluoroquinolonas como el esparfloxacino.

El desarrollo de resistencias a las fluoroquinolonas mediante mutaciones en las topoisomerasas ha sido ampliamente estudiado. La mutación se produce principalmente sobre la ADN-girasa (topoisomerasa II) [328] y secundariamente sobre la topoisomerasa IV, contribuyendo a mayores niveles de resistencia. Además de las mutaciones estructurales en los genes de las topoisomerasas, la resistencia a fluoroquinolonas se puede producir por una disminución en la permeabilidad de la pared bacteriana o una alteración en la actividad de las bombas de flujo dependientes de energía. La resistencia a las fluoroquinolonas producida por mutaciones conlleva una disminución de la susceptibilidad o resistencia a esta clase de antibióticos [329]. Sin embargo, las resistencias producidas por una disminución de la permeabilidad o alteración de las bombas de flujo, son menos específicas, generando múltiples resistencias cruzadas a otros antibióticos no relacionados estructuralmente, como las tetraciclinas [330]. En el sistema de flujo de antibióticos, las proteínas localizadas en la membrana bombean el fármaco desde el interior celular al exterior, antes de que dichos antibióticos puedan interactuar en el sitio activo de la ADN-girasa. Este flujo, constitutivo e inducible, es un mecanismo conocido de creación de resistencias a las fluoroquinolonas en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, y puede ser más importante que la mutación

secundaria en los genes que codifican la topoisomerasa IV. La enrofloxacin, al igual que otras fluoroquinolonas, se usa para tratar bacterias susceptibles en una variedad de especies. El tratamiento incluye infecciones de piel y tejidos blandos. Este fármaco se emplea rutinariamente para eliminar las posibles contaminaciones que se pueden producir en cultivos celulares por *Mycoplasma spp.*, ya que debido a su naturaleza hidrófoba, este fármaco entra en la célula y consigue acabar con estas infecciones de forma eficaz [331,332].

1.7.8. Enrofloxacin encapsulada en nanotransportadores de fármacos frente a infecciones intracelulares

Este antibiótico también ha sido objeto de estudio por su interés al vehiculizarlo en nanosistemas transportadores de fármacos. Se han visto previamente los motivos por los cuáles este fármaco podría mejorar su uso clínico siendo encapsulado en algún nanosistema como la toxicidad, la rápida distribución por el organismo y la falta de retención del fármaco en el interior celular. Esto lo convierte en un buen candidato para ser transportado en un nanosistema y mejorar así su perfil farmacocinético. Varios estudios realizados en modelos de *Salmonella spp.* mostraron una mejora en la concentración de enrofloxacin intracelular y una liberación controlada en el tiempo al estar encapsulada dentro de nanopartículas sólidas lipídicas frente al fármaco en solución [333,334]. Otro estudio empleando nanopartículas sólidas lipídicas mostró una mayor actividad antibacteriana frente a *Bacillus subtilis*, así como una menor toxicidad cuando la enrofloxacin iba encapsulada en SLPs [335]. También se han empleado liposomas encapsulando enrofloxacin y se ha demostrado que los liposomas cargados con el antimicrobiano son rápidamente fagocitados por macrófagos, mostrando un alto potencial como tratamiento frente a infecciones intracelulares [336,337].

Objetivos

El objetivo general que persigue esta Tesis Doctoral es el desarrollo de nanosistemas transportadores de fármacos basados en una composición lipídica para su aplicación como agentes terapéuticos frente a enfermedades de diferente etiología como son el cáncer o las infecciones bacterianas.

Los objetivos concretos que se han propuesto para alcanzar el objetivo general de esta Tesis Doctoral son los siguientes:

- Síntesis y caracterización de partículas sólidas lipídicas cargadas con el fármaco hidrofóbico, enrofloxacin.
- Síntesis y caracterización de liposomas encapsulando el antimicrobiano de naturaleza hidrófoba, cloranfenicol.
- Estudio detallado de la encapsulación y posterior perfil de liberación de los fármacos encapsulados en ambos nanosistemas lipídicos (liposomas y partículas sólidas lipídicas) en diferentes condiciones fisiológicas, así como el estudio del mecanismo cinético de liberación obtenido.
- Elección y puesta a punto de un modelo de metástasis pulmonar de melanoma en modelos murinos C57BL/6 para el posterior testado de la eficacia terapéutica de las partículas sólidas lipídicas cargadas con doxorubicina.
- Puesta a punto de un modelo de infección intracelular en macrófagos infectados por la bacteria *L. monocytogenes* para el posterior estudio de la eficacia y seguridad de los nanosistemas desarrollados mediante ensayos *in vitro*.
- Elección y puesta a punto de un modelo de infección intracelular en modelos murinos C57BL/6 para el posterior estudio de la eficacia terapéutica y toxicidad de los nanosistemas cargados con cloranfenicol y enrofloxacin.

CAPÍTULO 2. OBJETIVOS

Materiales y Métodos

3.1. Síntesis de Nanomateriales

3.1.1. Nanopartículas de óxido de hierro

La síntesis de las nanopartículas de óxido de hierro se llevó a cabo empleando el método de co-precipitación [338] y se realizó en el Instituto Ibérico Internacional de Nanotecnología (INL) en Braga (Portugal) durante mi estancia de investigación en el laboratorio del Dr. Manuel Bañobre, en colaboración con la Dra. Stefania Scialla.

Reactivos utilizados

Los siguientes reactivos se obtuvieron de la compañía Sigma-Aldrich: cloruro de hierro (III) hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 99 %; ref. 236489), cloruro de hierro (II) tetrahidratado ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 99 %; ref. 215422), ácido oleico (99 %; ref. O1008), solución de hidróxido de amonio (NH_4OH , 28-30 %; ref. 105423), cloroformo (CHCl_3 , 99.5 %; ref. C2432) y hexano (C_6H_{14} , 95 %; ref. 296090).

Síntesis de nanopartículas de óxido de hierro

Las nanopartículas de óxido de hierro estabilizadas con ácido oleico ($\text{Fe}_3\text{O}_4@AO$) se sintetizaron utilizando el método de co-precipitación modificado [338], como se muestra en la Figura 3.1. Para ello, se añadieron 9,2 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y 15 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 250 mL de agua desionizada. La mezcla se mantuvo en agitación durante 10 minutos a una temperatura de 50 °C. A continuación, se agregaron 30 mL de NH_4OH (12 M), dando como resultado la aparición de un precipitado oscuro de Fe_3O_4 . La reacción se realizó bajo atmósfera de nitrógeno para evitar procesos de oxidación. A continuación, se añadió el

ácido oleico (2,5 mL) y la mezcla se calentó a 80 °C durante 1 hora. El exceso del hidróxido de amonio y del ácido oleico se eliminaron mediante separación de las nanopartículas con el uso de un imán. El procedimiento de lavado de las mismas se repitió tres veces con agua desionizada y una vez con hexano. Finalmente, las nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO$, se suspendieron en cloroformo y se almacenaron a 4 °C.

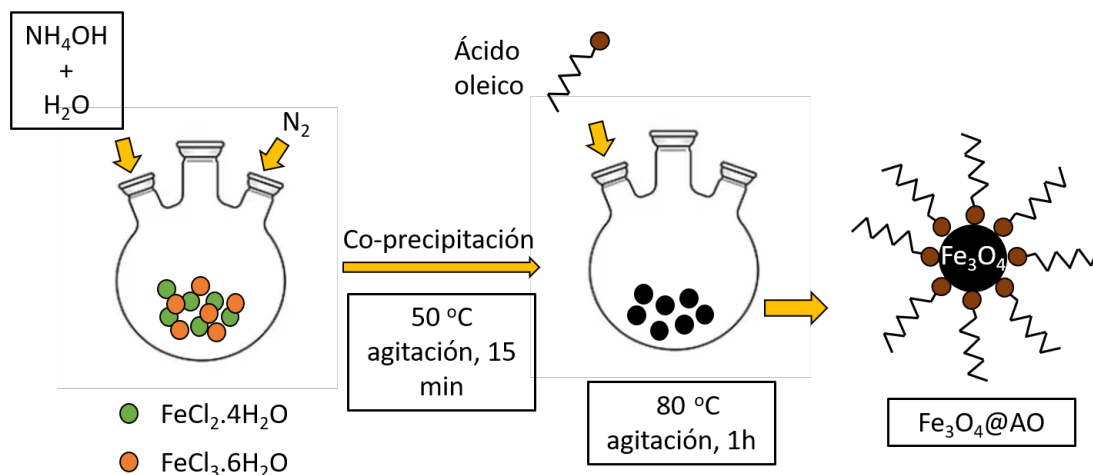


Figura 3.1: Síntesis de nanopartículas de óxido de hierro estabilizadas con ácido oleico (AO) por el método de co-precipitación.

3.1.2. Partículas sólidas lipídicas

La síntesis de las partículas sólidas lipídicas se realizó mediante el método fusión-emulsión modificado [339] en el Instituto Ibérico Internacional de Nanotecnología (INL) en Braga (Portugal), en el grupo del Dr. Manuel Bañobre.

Reactivos utilizados

La cera de Carnauba (T1; ref. E0001) fue adquirida a Koster Keunen Company, los colorantes hidrófobos, 3,3'-Diocetadecyloxacarbocyanine Perchlorate (DiO; ref. D275) y el 1,1'-Diocetadecyl-3,3',3'-Tetramethylindotricarbocyanine Iodide (DiR; Ref. D12731) ambos de Invitrogen. El polysorbato 80 (Tween 80; ref. P4780) y la enrofloxacin (Ref. 17849-5G-F) fueron adquiridos a Sigma Aldrich. La doxorubicina empleada en este estudio (ref. A14403) fue suministrada por Adooq Bioscience.

Síntesis de partículas sólidas lipídicas con doxorubicina: tratamiento de metástasis pulmonar

Para la síntesis de las partículas sólidas lipídicas (SLPs) se empleó el método de fusión-emulsión modificado (Figura 3.2) [339]. La técnica fue llevada a cabo por la Dra. Lorena García-Hevia. Se preparó en primer lugar la fase orgánica con 200 mg de cera de Carnauba, el fármaco (doxorubicina) se incorporó al 20 % del peso total de la reacción, las nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO$ suspendidas en cloroformo a un 30 % del peso total de la

reacción y el DiO, también disuelto en cloroformo a una proporción de 0,25 % del peso total de la reacción. A continuación se aplicó calor a dicha fase con una decapadora (Einhell; ref: 4520130) hasta derretir la cera, eliminar el cloroformo y conseguir la disolución de todos los componentes. Antes de sonicar, se añadió la fase acuosa de la reacción (Tween 80 + agua miliQ) en una proporción del 12,5 % hasta un volumen total de 4,5 mL de síntesis. Posteriormente, la mezcla de ambas fases se sonicó (Branson digital sonifier 250) con una amplitud del 25 % durante 2 minutos, en intervalos de 20 segundos. Durante el tiempo de sonicación, se aplicó calor a la muestra para facilitar la formación de las partículas. A continuación, la muestra fue inmediatamente enfriada por inmersión en hielo, y posteriormente centrifugada para eliminar los restos desechables de la síntesis a 4.700 g durante 10 minutos. El precipitado fue descartado y el sobrenadante obtenido con la suspensión de las nanopartículas fue almacenado a 4 °C para conservar la estabilidad de la formulación. Para un correcto almacenamiento de las muestras, éstas fueron posteriormente liofilizadas con un 5 % (p/p) de sacarosa como crioprotector.

Síntesis de partículas sólidas lipídicas con enrofloxacin: tratamiento de infecciones intracelulares

Para la síntesis de las SLPs cargadas con el antibiótico enrofloxacin se empleó el mismo método previamente descrito, sustituyendo el colorante hidrófobo y el fármaco. En este caso se empleó el antibiótico enrofloxacin y el colorante hidrófobo DiR.

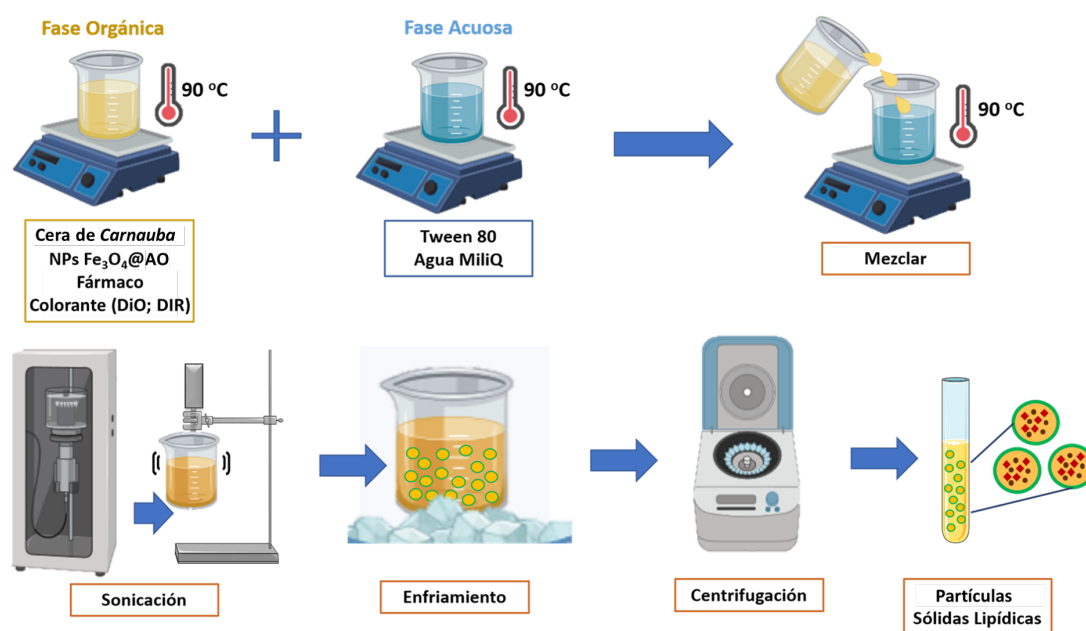


Figura 3.2: Síntesis de partículas sólidas lipídicas por el método de fusión-emulsión modificado.

3.1.3. Liposomas

La síntesis de los liposomas se llevó a cabo mediante el método de hidratación del *film* modificado [340, 341].

Reactivos utilizados

El liofilizado precursor de liposomas (Pronanosomes Lipo N) fue adquirido a la compañía Nanovex Biotechnologies S.L., el cloranfenicol (Ref. MB02402-25G) a Nzytech, la acetona 99,6 % (Ref. ACET-POP-1K0) a Labkem, el colorante hidrófobo 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindotricarbocyanine Iodide (DiR; ref. D12731) a Invitrogen y el dimetilsulfóxido 99,9 % (ref. 131954.1611) a Panreac Applichem.

Síntesis de liposomas cargados de cloranfenicol

Como primer paso y con el objetivo de optimizar el método de síntesis de los liposomas cargados con cloranfenicol, se realizaron diversas pruebas previamente empleando diferentes colorantes para su encapsulación en los liposomas como prueba de concepto. Estos colorantes fueron dos, uno de naturaleza hidrófila (naranja de acridina; ref. A6014; Sigma) y otro de naturaleza hidrófoba (1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate (DiI); ref. D282; Invitrogen). Para la síntesis de los liposomas se empleó el método de hidratación del *film* modificado (Figura 3.3) [340, 341]. Se partió de 100 mg de lípido (fosfatidilcolina y colesterol) liofilizado, precursor de liposomas, al que se le añadió una solución acuosa de 2 mL. Dicha solución acuosa estaba compuesta por agua bidestilada a la que se le añadió el fármaco a encapsular (Cloranfenicol) a una concentración de 1 mg/mL. En los casos en los que fue necesario añadir un colorante para poder estudiar el comportamiento de estos liposomas en cultivos celulares, dicho colorante (DiR) se añadió a esta fase acuosa junto al fármaco a encapsular. Ambos componentes (fármaco y colorante) son de naturaleza hidrofóbica por lo que para solubilizarlos adecuadamente en la solución acuosa fueron empleados coadyuvantes. En el caso del cloranfenicol, se usó acetona al 1 % y en el caso del colorante (DiR) se disolvió en una solución de DMSO al 5 % en agua. A continuación esta solución acuosa de 2 mL se añadió al vial con el lípido liofilizado y se dejó en agitación suave a 50 °C durante 20 minutos. Esta temperatura es superior a la temperatura de transición del lípido, permitiendo que el lípido cambie de estado gel a cristal-líquido aumentando su fluidez. Este cambio en la fluidez del lípido junto a la fase de hidratación, da lugar a la formación del liposoma. Tras este tiempo en agitación, los liposomas se sonicaron (5 pulsos, en intervalos de 5 segundos y a una frecuencia de 20 kHz) en un equipo SONICS Vibra-Cell VCX130 Ultrasonic Processor (Sonics & Materials Inc.). Previo a la sonicación, el vial es agitado 2 minutos manualmente reproduciendo movimientos circulares que permitan la hidratación del lípido que ha quedado adherido en la pared del vial. Tras la sonicación, la suspensión de liposomas obtenida se mantuvo 12 horas a 4 °C para completar el proceso de formación de las “nano” vesículas lipídicas. Una vez formados, los liposomas sintetizados se lavaron mediante centrifugación a 12.000 g, 10 minutos dos veces en agua destilada. El primer lavado se realizó en agua con un 5 % DMSO para eliminar los posibles restos de colorante o con una solución de acetona al 1 % en el caso de querer eliminar los posibles restos de cloranfenicol.

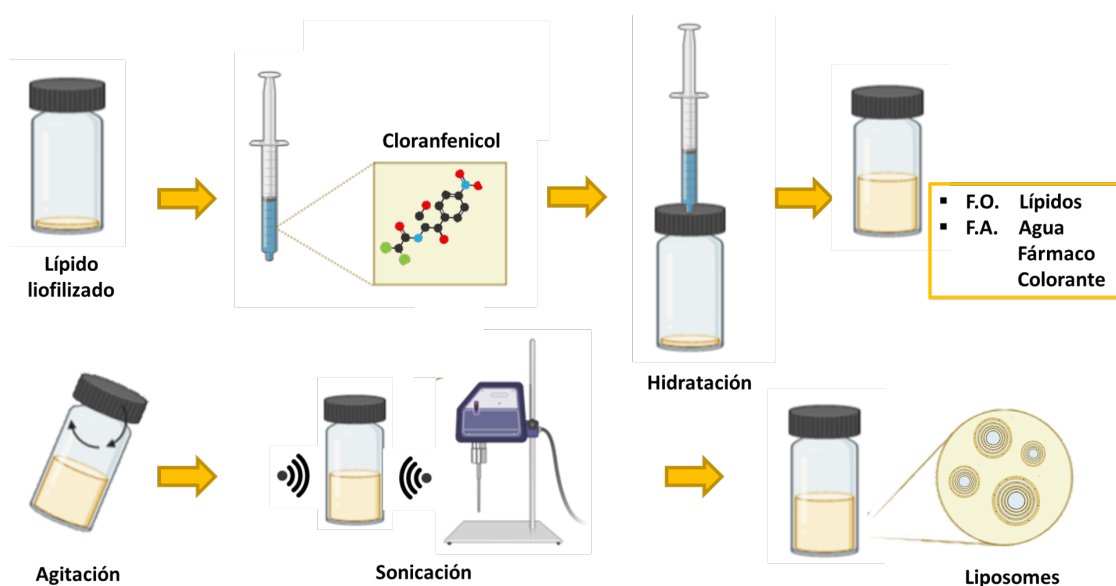


Figura 3.3: Esquema donde se muestran los distintos pasos del proceso de síntesis de liposomas cargados con antibiótico.

3.2. Caracterización de los nanomateriales

3.2.1. Potencial zeta

Cuando una partícula se dispersa en un disolvente polar, como por ejemplo, una disolución de electrolito, esta partícula sólida adquiere una carga eléctrica superficial. Independientemente del electrolito, la carga neta superficial debe estar compensada por iones en torno a la partícula, de modo que se compense la carga eléctrica del sistema. La carga superficial y la contracarga compensatoria forman una doble capa eléctrica. La carga neta de la superficie de la partícula afecta a la distribución de los iones y a la región circundante interfacial, resultando en un aumento de la concentración de iones de carga opuesta a la de la partícula. La capa líquida que rodea la partícula tiene 2 partes, una región interior llamada capa de Stern, la cual tiene iones fuertemente ligados y la capa externa o difusa, región difusa en la que los iones están unidos más débilmente (Figura 3.4) [342].

Un punto de especial interés es el potencial donde se unen la capa difusa y la de Stern. Este potencial es conocido como potencial zeta (ζ). Este potencial es importante porque puede ser medido de una manera simple, mientras que la carga de la superficie de la partícula, así como su potencial no se pueden medir. El potencial ζ puede ser una manera efectiva de controlar el comportamiento del coloide, puesto que indica cambios en el potencial de la superficie y en las fuerzas de repulsión entre los coloides. El potencial ζ , es por tanto, un indicador de la estabilidad del sistema coloidal. Si todas las nanopartículas en suspensión tienen un alto nivel de cargas positivas o negativas, el valor del potencial ζ es alto y no tienden a flocular. Sin embargo, si los valores del potencial ζ son bajos, no existirá entre las nanopartículas suficiente fuerza como para repelerse y tienden así a agregarse. Su medición aporta información detallada de las causas de la dispersión, agregación o floculación del material en estudio al ponerlo en presencia de otro tipo de sustancias con

carga conocida, en este caso el comportamiento de las nanopartículas sintetizadas en el medio.

La medición del potencial zeta se basa en el principio de que el comportamiento de los coloides está determinado por las cargas eléctricas presentes en su superficie. Estas cargas producen fuerzas de repulsión electrostática. Se considera que valores de 30 mV o superiores son suficiente para que el sistema coloidal sea estable. Además de una medida de estabilidad de la suspensión, conocer el valor de la carga superficial de un nanomaterial va a indicar la localización que puede tener las sustancias (fármaco o colorante) que se han incorporado en la síntesis, si este se presenta en mayor o menor medida retenido en el interior o adsorbido en superficie debido a un fenómeno de atracción electrostática o en ambos.

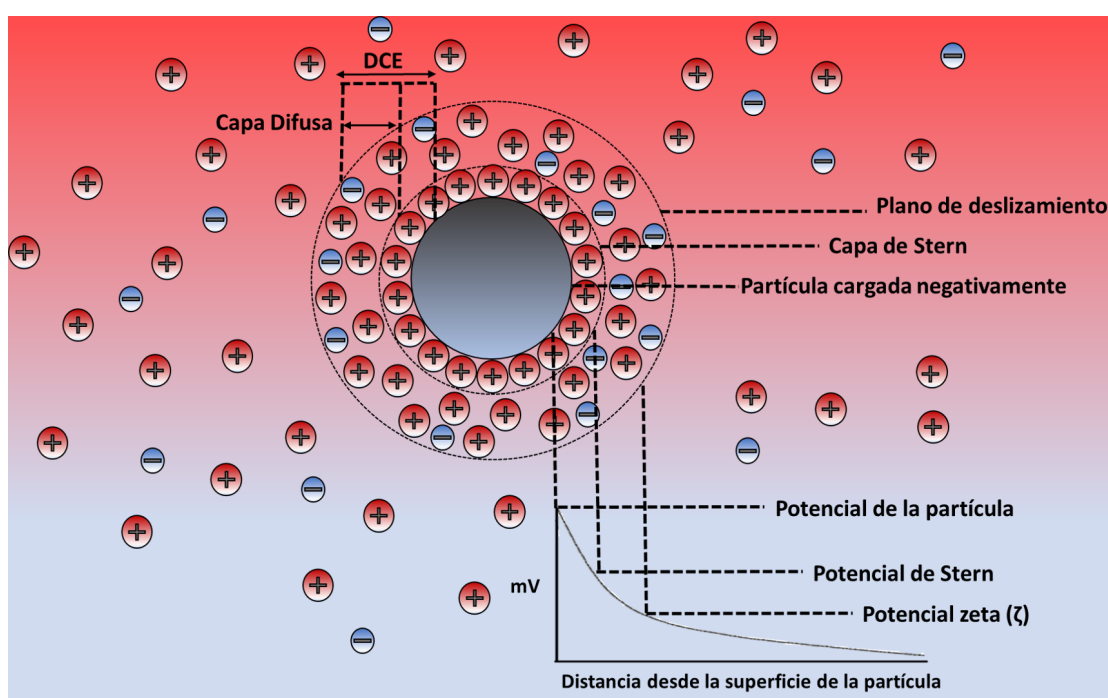


Figura 3.4: Esquema representativo de la diferencia de potencial como una función de la distancia desde la superficie de una partícula suspendida en un medio de dispersión [342].

3.2.2. Tamaño

La dispersión dinámica de luz (DLS) permite obtener una estimación del tamaño o la distribución de tamaños de moléculas y nanopartículas en suspensión en la región submicrométrica. Esta técnica obtiene información del movimiento Browniano de las nanopartículas y lo relaciona con su tamaño nanométrico: a mayor tamaño de las nanopartículas, menor desplazamiento y menor velocidad. Cuando se tienen nanopartículas en disolución, éstas se desplazan y al hacer incidir un haz de luz sobre ellas, es dispersado y su intensidad varía con el tiempo. Tanto la determinación del potencial ζ como el tamaño por DLS de las partículas sintetizadas, se midieron en suspensiones de las partículas en agua destilada empleando el equipo Nano Particle Analyzes SZ-100 HORIBA Scientific, en el Instituto Ibérico Internacional de Nanotecnología (INL). En el caso de los liposomas se empleó el

equipo Zetasizer Nano-ZS del Departamento de Química e Ingeniería Biomolecular de la Universidad de Cantabria.

Además, con este equipo se midió el índice de polidispersión, que informa acerca de la homogeneidad de los tamaños de las nanopartículas en suspensión y tiene un valor entre 0 y 1. Cuanto más cercano a 0 es el valor del índice de polidispersión, mayor es la homogeneidad de la muestra.

3.2.3. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Para la caracterización morfológica de los nanosistemas sintetizados (SLPs, nanopartículas de Fe_3O_4 @AO y liposomas) se realizó un análisis mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Esta técnica de microscopía utiliza un haz de electrones para visualizar un objeto. Para ello, se emplea una muestra ultrafina y la imagen se obtiene a partir de los electrones que atraviesan dicha muestra. En este caso las diluciones de los diferentes nanomateriales se montaron y dejaron secar sobre rejillas de cobre con recubrimiento de carbono, de malla 400 (EM Resolutions).

Los liposomas sintetizados, al tratarse de nanovesículas formadas por membranas lipídicas con compartimentos acuosos intercalados y de materiales orgánicos, deben ser teñidos por un compuesto que le permita aumentar el contraste y poder localizar así las nanovesículas. Se empleó como tinción negativa el acetato de uranilo al 2 % en agua tras ser filtrado con un filtro de jeringa (ref. Jet Biofil) de un tamaño de poro de 0,45 micras y conservado a 4 °C. Tras teñir la muestra durante 1 minuto con el acetato de uranilo, la rejilla con la muestra se lavó tres veces en agua destilada durante un minuto cada lavado.

Los microscopios utilizados para el análisis fueron: por un lado, un JEOL JEM 1011 equipado con una cámara digital Gatan de alta resolución disponible en los Servicios Tecnológicos del Instituto de Investigación Valdecilla – IDIVAL; por otro lado, las SLPs y las nanopartículas de Fe_3O_4 sintetizadas en el INL (Instituto Ibérico Internacional de Nanotecnología) fueron caracterizadas mediante un JEOL JEM 2100.

3.2.4. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Para la caracterización morfológica superficial de las SLPs sintetizadas, se realizó un análisis mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Esta técnica de microscopía electrónica es capaz de producir imágenes de alta resolución de la superficie de una muestra utilizando las interacciones electrón-materia, aplicando un haz de electrones para formar una imagen. La resolución de esta técnica es menor a la adquirida mediante la microscopía electrónica de transmisión. En este caso, las diluciones de las partículas se montaron y dejaron secar sobre un portamuestras de silicio. El microscopio utilizado para el análisis fue un SEM Quanta 650 FEG, (FEI® Company) del Instituto Ibérico Internacional de Nanotecnología (INL).

3.2.5. Nanopartículas de óxido de hierro: morfología y propiedades magnéticas

Las nanopartículas de Fe_3O_4 sintetizadas según el método de co-precipitación anteriormente descrito (Fig. 3.1) se caracterizaron mediante microscopía electrónica de transmisión (Fig. 3.5). Se determinó una distribución de tamaños, con un diámetro medio de 13 ± 3 nm de una muestra con una $N=116$ (Fig. 3.5). Con la técnica de plasma de acoplamiento inductivo (ICP), se determinó la concentración de hierro final de las nanopartículas, siendo ésta de $48,6 \pm 1,9$ mg/mL. Dicha técnica se explicará más extensamente en la Sección 3.6.7 de Materiales y Métodos.

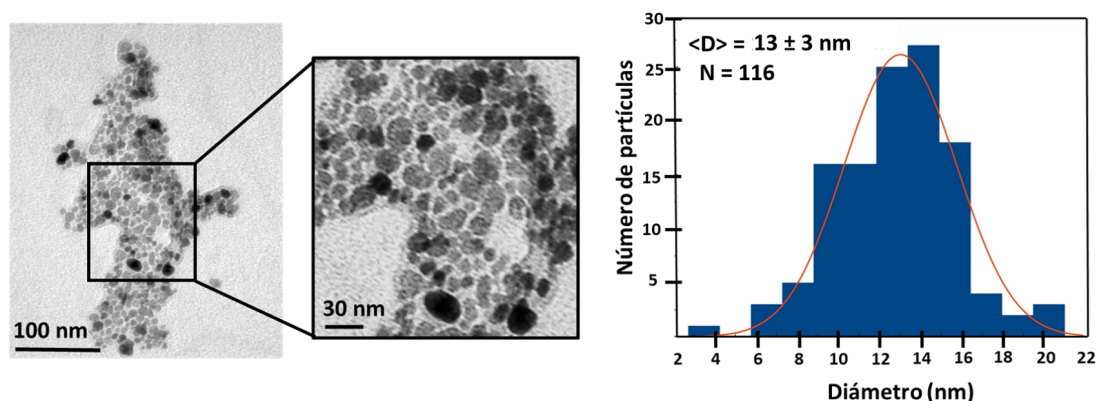


Figura 3.5: Microfotografías de las nanopartículas de Fe_3O_4 @AO sintetizadas observadas por microscopía electrónica de transmisión (izquierda). Histograma con la distribución de tamaños de las nanopartículas (derecha).

Para conocer las propiedades magnéticas de las nanopartículas Fe_3O_4 se midió el ciclo de histéresis (Figura 3.6). En un ciclo de histéresis se representa la magnetización que presenta un compuesto en función del campo magnético aplicado. El valor del campo al cual el material pierde la magnetización se denomina campo coercitivo (H_c). En el caso de las sustancias superparamagnéticas este valor es nulo o muy próximo a cero. Las nanopartículas sintetizadas mostraron un comportamiento superparamagnético característico de nanopartículas de Fe_3O_4 de dominio único e indica la utilidad que presentan este tipo de nanopartículas en el campo biomédico, en aplicaciones para diagnóstico de imagen (MRI), e hipertermia [343]. Por otro lado, con el empleo de las curvas de los ciclos ZFC-FC (Fig. 3.6), se puede obtener la temperatura de bloqueo, que indica la temperatura por debajo de la cual los momentos magnéticos están bloqueados. Esto quiere decir que a temperaturas superiores a dicha temperatura, el material se va a comportar como superparamagnético. En este caso, la temperatura de bloqueo que se obtuvo fue de $\approx 160\text{K}$.

La medida de las propiedades magnéticas se realizó en el Instituto Ibérico Internacional de Nanotecnología (INL), por el Dr. Juan Gallo. Se midió la magnetización en función del campo aplicado (100 Oe) a 300K (Fig. 3.6). El equipo utilizado fue un magnetómetro de muestra vibrante, VSM; EV9, Lot-Oriel.

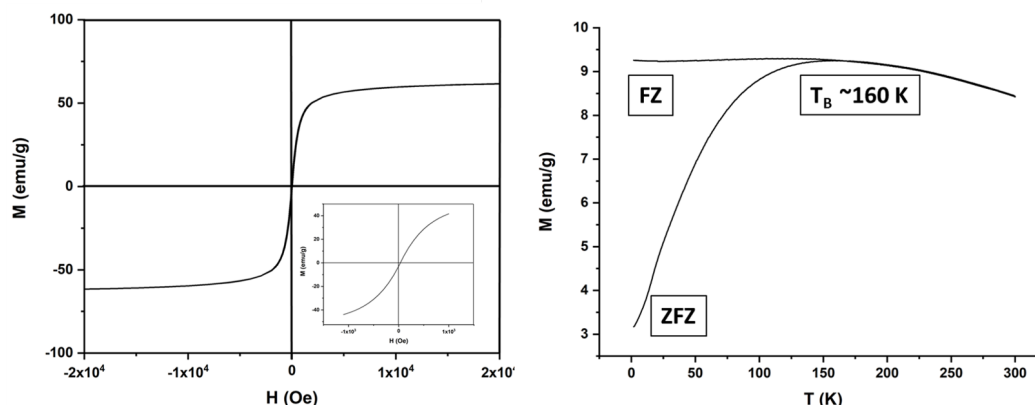


Figura 3.6: Propiedades magnéticas de las nanopartículas sintetizadas. Ciclo de histéresis (izquierda). Curva de ciclo ZFC-FC (derecha).

3.3. Eficiencia de encapsulación y perfil de liberación

3.3.1. Eficiencia de encapsulación de la doxorubicina en las partículas sólidas lipídicas

La eficiencia de encapsulación de la doxorubicina en las SLPs se determinó mediante un método indirecto, cuantificando la concentración de fármaco no encapsulado frente a la cantidad total de doxorubicina añadida en la síntesis. La determinación se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en el Instituto Ibérico Internacional de Nanotecnología (INL), en el grupo del Dr. Manuel Bañobre. Este estudio fue realizado por la Dra. Lorena García-Hevia y el Dr. Juan Gallo.

La HPLC es una técnica que se emplea para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y una columna cromatográfica. El compuesto pasa por la columna cromatográfica o fase estacionaria (un cilindro con pequeñas nanopartículas redondeadas que presentan ciertas características químicas en su superficie) mediante el bombeo de un líquido (fase móvil) a alta presión a través de dicha columna. La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades junto a la fase móvil, sus componentes van siendo retenidos y, en consecuencia, disminuyendo su velocidad dependiendo de las interacciones químicas o físicas de la muestra con la fase estacionaria a medida que pasan por la columna. El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la composición de la fase estacionaria, de la fase móvil y de la naturaleza del compuesto. Una mejora introducida en la técnica de HPLC descrita fue la variación en la composición de la fase móvil durante el análisis, conocida como elución en gradiente. Un gradiente normal en una cromatografía de fase reversa puede empezar a un 5 % de acetonitrilo y progresar de forma lineal hasta un 50 % en 25 minutos. El gradiente utilizado varía en función de la hidrofobicidad del compuesto y separa los componentes de la muestra en función de la afinidad del compuesto por la fase móvil utilizada respecto a la afinidad del mismo por la fase estacionaria.

En el caso de la cuantificación de la doxorrubicina, se usó un gradiente de agua: acetonitrilo (de 100 % a 25:75 %) y una columna Aeris de 1,7 μm de péptido XB-C18.

3.3.2. Eficiencia de encapsulación de la enrofloxacin en las partículas sólidas lipídicas

La eficiencia de encapsulación de la enrofloxacin en las SLPs se determinó también mediante un método indirecto, pero en este caso se empleó la espectrofotometría UV-Visible para cuantificar la concentración de antibiótico encapsulada. La determinación se realizó en el Instituto Ibérico Internacional de Nanotecnología (INL).

La espectrofotometría UV-visible es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Dicha técnica se basa en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas de ciertas longitudes de onda (λ) (rango UV-Vis), y a su vez que la intensidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración. Para hacer este tipo de medidas se emplea un espectrofotómetro, en el que se puede seleccionar la longitud de onda de la luz que pasa por una solución y medir la intensidad de la luz absorbida por la misma frente a una referencia. Las longitudes de onda de las radiaciones que una molécula puede absorber y la eficiencia con la que se absorben dependen de la estructura de la molécula (transiciones electrónicas), así como de las condiciones del medio (pH, temperatura, fuerza iónica o constante dieléctrica), por lo que dicha técnica es importante para la determinación y caracterización de biomoléculas. Las moléculas pueden absorber energía luminosa y almacenarla en forma de energía interna transformándose en calor. Cuando la luz es absorbida por una molécula se origina una transición electrónica desde el estado energético fundamental a un estado de mayor energía (estado excitado). Cada molécula presenta una serie de estados excitados (o bandas) propias de esa molécula. Como consecuencia, la absorción que a distintas longitudes de onda presenta una molécula constituye una señal de identidad de la misma y es lo que se conoce como espectro de absorción.

El espectro de absorción es una representación gráfica que muestra la luz absorbida a diferentes valores de λ a partir de una solución diluida de un compuesto, cuya absorbancia máxima entra dentro del rango de medida del espectrofotómetro. En dicha representación se observa el valor de absorbancia, es decir, la intensidad de la luz tras haber atravesado una muestra, a diferentes longitudes de onda I (λ) frente a un blanco que contenga el disolvente de la solución (I_0) de la muestra a caracterizar ($A(\lambda) = -\log(I/I_0)$). A partir del espectro de absorción se obtendrá el valor de λ a la que el compuesto presenta la mayor absorbancia. Dicha λ se utilizará a la hora de hacer determinaciones cualitativas y cuantitativas del compuesto. La ley de Lambert-Beer (3.1) establece que la absorbancia (A), medida de la luz absorbida por una sustancia de una solución, es directamente proporcional a su concentración. También depende de la distancia que recorre la luz por la solución. A igual concentración, cuanto mayor distancia recorre la luz por la muestra más moléculas se encontrará. Por último, depende de ϵ , una constante de proporcionalidad denominada coeficiente de extinción molar que es específica de cada cromóforo. Como la absorbancia es adimensional, las dimensiones del coeficiente de extinción dependen de las de la concentración (c) y espesor (l) de la muestra atravesada. (l) se expresa siempre en cm

mientras que la concentración se hace, siempre que sea posible, en molaridad (M), con lo que las dimensiones del coeficiente (ϵ) resultan ser $M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Este coeficiente se denomina coeficiente de extinción molar (ϵ_M). La ley de Lambert-Beer se cumple para soluciones diluidas, ya que para valores de concentración altos se pierde la linealidad.

$$A(\lambda) = -\log(I/I_0) = \epsilon(\lambda) \cdot c \cdot l \quad (3.1)$$

Para conocer la concentración de un compuesto en una muestra mediante la medida de la absorbancia se realiza previamente una recta de calibrado. Para ello se preparan soluciones de diferentes concentraciones del compuesto, determinándose para cada una de ellas el valor de la absorbancia a una determinada λ , p.ej. el máximo de absorción. Estos valores de absorbancia se representan en el eje de ordenadas y los de concentración en el eje de abscisas. Se observará que, a bajas concentraciones, el aumento de concentración se corresponde con un incremento lineal en la absorbancia (zona de cumplimiento de la ley de Lambert-Beer).

3.3.3. Eficiencia de encapsulación del cloranfenicol en los liposomas

En el caso de los liposomas se empleó un método directo para conocer la eficacia de encapsulación del cloranfenicol. Para ello, se tomó un volumen conocido de la síntesis de liposomas y se centrifugó durante 10 minutos a 12.000 g dos veces. La primera vez se empleó agua destilada con un 1 % de acetona para eliminar los posibles restos de cloranfenicol no encapsulado, el otro lavado solo con agua destilada. A continuación se eliminó el sobrenadante y al *pellet* de liposomas se le añadió 1 mL de metanol extra puro (ref. ME0301005 de Scharlau). El metanol rompe los liposomas formados, elimina la parte lipídica y permite que el fármaco encapsulado se solubilice. Se empleó un vórtex para dispersar la muestra en el metanol y se midió la absorbancia del cloranfenicol. Mediante el empleo de una recta de calibrado se obtuvo la concentración de cloranfenicol encapsulada respecto al total de fármaco añadido al comienzo de la síntesis.

En todos los casos, la eficiencia de encapsulación (E.E.) se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$EE(\%) = \frac{\text{Cantidad fármaco encapsulado}}{\text{Cantidad fármaco total}} \cdot 100 \quad (3.2)$$

3.3.4. Ensayo de liberación de la doxorrubicina en PBS *in vitro*

El perfil de liberación de la doxorrubicina en tampón fosfato salino (PBS [137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1,8 mM KH_2PO_4 , pH = 7,4]) es un ensayo que permite estudiar el comportamiento de las partículas en una solución que simula las condiciones fisiológicas. Para este análisis, se tomó un volumen de 0,3 mL de una solución de doxorrubicina a una concentración de 20 mg/mL en PBS (pH = 7,4). La dispersión

se introdujo en una membrana de diálisis (membranas de celulosa de corte de 14 kDa; Sigma-Aldrich). Posteriormente, la membrana se sumergió en PBS, bajo condiciones controladas de agitación (300 rpm) y temperatura 37 °C. El método de diálisis permitió la difusión del fármaco a través de la membrana de celulosa a la solución receptora de tampón fosfato (Figura 3.7). Se tomaron muestras de 1 mL a diferentes tiempos y se midieron mediante espectroscopía de fluorescencia en un Edinburgh Inst. FLSP-920, del grupo de Altas Presiones y Espectroscopía de la Universidad de Cantabria.

Los valores se compararon con los de una curva de calibración de la doxorubicina. Finalmente, los datos del perfil de liberación de la doxorubicina en función del tiempo se ajustaron siguiendo el modelo cinético de Korsmeyer-Peppas [344] como se describirá posteriormente.

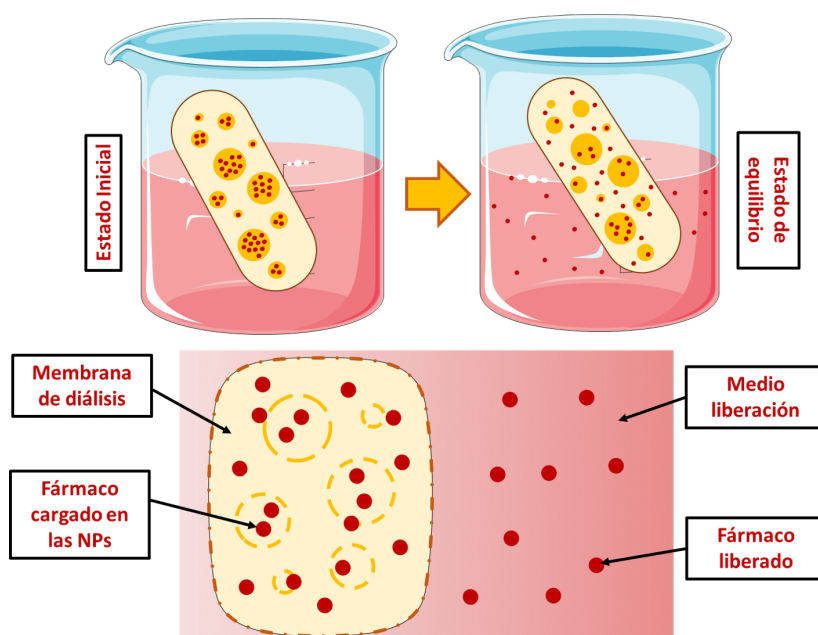


Figura 3.7: Ensayo *in vitro* de liberación de fármaco de las partículas empleando el método de diálisis.

Fluorimetría

Para poder cuantificar la liberación de la doxorubicina *in vitro*, se midieron las muestras de 1 mL de volumen de PBS (pH = 7,4) siguiendo el proceso descrito previamente en la Sección 3.3.4 de Materiales y Métodos y se analizó empleando la espectroscopía de fluorescencia (Fig. 3.8). Mediante esta técnica, la muestra se excita desde su estado electrónico fundamental hasta uno de sus estados excitados, generalmente mediante radiación UV. Las vibraciones moleculares causan una pérdida de energía hasta que se alcanza el estado vibracional más bajo del estado electrónico excitado. Después la molécula se relaja a uno de los distintos niveles de vibración del estado electrónico fundamental, liberando su energía en forma de fotones (luz) de energía inferior a la de excitación. Dado que el electrón puede caer a cualquiera de los diferentes niveles vibracionales del estado fundamental, los fotones emitidos tendrán diferentes energías y, por lo tanto, longitud de onda. Así, manteniendo la luz de excitación a una longitud de onda constante y midiendo las diferentes longitudes

de onda de la luz emitida por una muestra (utilizando un monocromador), se obtiene el espectro de emisión. Para obtener el espectro de excitación, se detecta la luz emitida a una longitud de onda determinada, y la muestra se va excitando a diferentes longitudes de ondas mediante un monocromador de excitación.

El equipo utilizado en este caso fue el espectrofluorímetro Edinburgh Instruments FLSP920 equipado con dos monocromadores (para excitación y emisión) del Grupo de Altas Presiones y Espectroscopía de la Universidad de Cantabria. Consta, además, de detectores fotomultiplicadores para visible, extendido visible y NIR y una lámpara continua de Xe de 450 W.

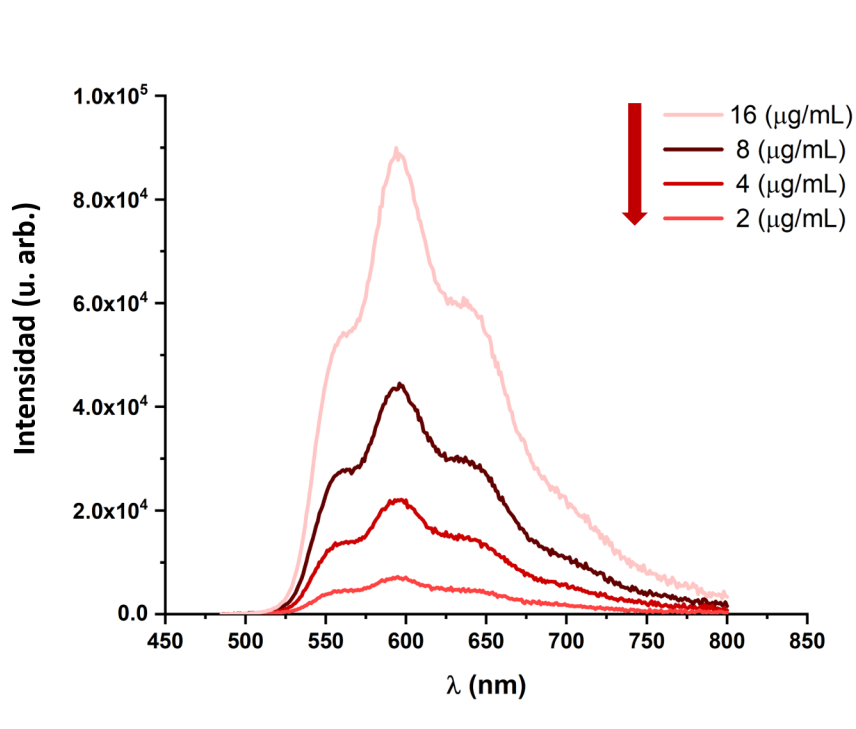


Figura 3.8: Espectros de fluorescencia de la doxorrubicina en PBS a distintas concentraciones para realizar la curva patrón o curva de calibrado.

3.3.5. Ensayo de liberación de la enrofloxacin y del cloranfenicol *in vitro*

El perfil de liberación de los dos antibióticos (enrofloxacin y cloranfenicol) se realizó en dos medios diferentes: en PBS, para simular el medio fisiológico (pH = 7,4) y en medio lisosomal sintético (25 mM MES–NaOH que contiene 0,5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ y 200 mM KCl [pH = 4,5]) [345] simulando al medio endolisosomal. En el caso del ensayo de liberación de las SLPs cargadas con enrofloxacin, se siguió el mismo procedimiento que el explicado en el caso de la doxorrubicina (Sección 3.3.4 de Materiales y Métodos), pero en este caso las muestras de 1 mL tomadas a diferentes tiempos se midieron empleando espectrofotometría en un Nanodrop (DeNovix DS-11; GC Biotech) del Departamento de Biología Molecular de Medicina, y un espectrofotómetro Cary 6000i UV-Vis-NIR del Grupo de Altas Presiones y Espectroscopía, ambos de la Universidad de Cantabria.

En el caso de los liposomas cargados con cloranfenicol, se añadió un volumen de 0,3 mL de la síntesis inicial, a una concentración de lípido en agua de 50 mg/mL. Estas muestras también se cuantificaron por espectrofotometría en los mismos equipos empleados para las SLPs. Los valores de las muestras de ambos antibióticos se compararon con los de una curva de calibración realizada previamente de los dos fármacos en ambos medios de liberación (PBS y lisosomal). Finalmente, los datos del perfil de liberación de los dos antibióticos en función del tiempo se ajustaron siguiendo el mismo modelo cinético que en el caso de la doxorrubicina, el modelo de Korsmeyer-Peppas.

3.3.6. Modelos cinéticos: modelo Korsmeyer-Peppas

Entre los modelos matemáticos más utilizados para analizar y describir el mecanismo mediante el cual ocurre el proceso de liberación de un fármaco de un nanosistema, se encuentran los propuestos por Higuchi [346] y Korsmeyer-Peppas en 1983 [344]. Higuchi propuso un modelo matemático ampliamente utilizado para describir el proceso empírico de liberación de fármacos, el cual cumple con la Ley de Fick y se representa mediante la ec. (3.3): donde M_t/M es la fracción de fármaco liberada en un tiempo t y k es la velocidad de liberación. Por otro lado, Korsmeyer y Peppas propusieron un modelo matemático que es generalmente lineal para valores de $M_t/M < 0,6$, es decir, valores de fracción de fármaco liberado por debajo del 60 %. Este modelo intenta explicar mecanismos de liberación de fármacos donde se presenta erosión y/o disolución de la matriz y permite entender la liberación no lineal de fármacos. No es más que una forma generalizada de la ecuación de Higuchi que se expresa mediante la ec. (3.4): donde k es la velocidad de liberación que incorpora características estructurales y geométricas del sistema de liberación, y n es el exponente que indica el mecanismo mediante el cual ocurre la liberación del fármaco (Tabla (3.1). El valor del exponente n nos da información sobre la cinética de liberación del fármaco, por lo que si dicho exponente es inferior o igual a 0,5, la liberación del fármaco tiene lugar a través de un fenómeno de difusión de tipo Fickiano. Si n es mayor o igual a 1, el mecanismo de liberación del fármaco depende del proceso de descomposición de la matriz; y cuando n toma valores entre 0,5 y 1 indica que la liberación del fármaco es debida a un mecanismo de difusión no Fickiano o anómalo, que consiste en una combinación de mecanismos de difusión y de erosión de la matriz. Estos valores pueden mostrar pequeñas variaciones según la geometría del sistema de liberación empleado, como se muestra en la Tabla 3.1 [347,348].

$$\frac{M_t}{M_n} = kt^{\frac{1}{2}} \quad (3.3)$$

$$\frac{M_t}{M_n} = kt^n \quad (3.4)$$

Tabla 3.1: Interpretación del exponente de difusión (n) y el mecanismo de liberación del fármaco correspondiente según el modelo matemático de Korsmeyer-Peppas y en base a la geometría del sistema de liberación.

Exponente de difusión (n)			Mecanismo de Liberación
Capa/película	Cilindro	Esfera	
$<0,5$	$<0,45$	$<0,43$	Difusión Tipo Fick
$0,5 < n < 1$	$0,45 < n < 0,89$	$0,43 < n < 0,85$	Difusión anómala (No tipo Fick)
$n = 1$	$n = 0,89$	$n = 0,85$	Transporte Caso II
$n > 1$	$n > 0,89$	$n > 0,85$	Transporte Super-caso II

3.4. Ensayos *in vitro* en cultivos celulares

3.4.1. Soluciones

Los medios líquidos o soluciones que se emplearon en el crecimiento y mantenimiento de los cultivos celulares fueron los siguientes:

IMDM: del inglés *Iscove's Modified Dulbecco's Medium*, medio de cultivo para el crecimiento *in vitro* de células eucariotas, recomendado para cultivos celulares de alta densidad o proliferación rápida como los macrófagos. Presenta L-glutamina y rojo fenol como indicador de pH (ref. P04-20350) de Panbiotech.

HBSS: del inglés *Hank's Balanced Salt Solution*, solución salina rica en iones bicarbonato. Formulación: 400 mg/L de KCl, 60 mg/L de KH_2PO_4 , 8.000 mg/L de NaCl, 350 mg/L NaHCO_3 , 47,88 mg/L de Na_2HPO_4 y 1.000 mg/L de glucosa. (ref. P04-34500) de Panbiotech.

PBS: del inglés *Phosphate-Buffered Saline*, solución salina isotónica. No presenta iones calcio, magnesio ni rojo fenol como indicador de pH. (pH final: 7,4) (ref. 70011-036) GibcoTM; Fisher Scientific.

Suero bovino fetal (SBF): como suplemento al medio de cultivo celular para favorecer el crecimiento y la adhesión de las células (ref. 26140079) GibcoTM; Fisher Scientific.

Gentamicina: el sulfato de gentamicina presenta un amplio espectro de acción bacteriano y es estable a un amplio rango de temperaturas y pH (ref. BE02-012E) de Lonza.

3.4.2. Líneas celulares

En este estudio se emplearon dos líneas celulares, una de melanoma maligno de piel de ratón (B16-F10 [ATCC CRL-6475]) y otra de macrófagos de sarcoma de retículo de ratón (J774A.1 [ATCC TIB-67]). La primera línea celular se empleó en el estudio del tratamiento frente a la metástasis pulmonar y la segunda línea celular se usó en el estudio del tratamiento frente a infecciones intracelulares. Ambas líneas celulares fueron crecidas en medio IMDM, suplementado con SBF al 10 % al que se le añadió el antibiótico gentamicina a una concentración de uso de 10 $\mu\text{g/mL}$. Las células se incubaron a 37 °C con una atmósfera de CO_2 al 5 % y una humedad relativa del 95 %. La manipulación de las líneas celulares se realizó en condiciones estériles en campana de flujo laminar.

3.4.3. Microscopía de fluorescencia

Microscopía de epifluorescencia

El microscopio de epifluorescencia es un microscopio óptico. En un microscopio óptico convencional la luz atraviesa la muestra estudiada, mientras que en un microscopio de epifluorescencia la luz no atraviesa la muestra sino que el mismo objetivo que ilumina y recoge la luz emitida por la muestra. Su funcionamiento se basa en la propiedad de fluorescencia que tienen unas moléculas denominadas fluorocromos. Estos fluorocromos son sustancias que presentan la propiedad de emitir un fotón de una longitud de onda determinada cuando son excitados por un fotón incidente de una longitud de onda a la cual absorbe. La parte de la molécula que emite la fluorescencia se denomina fluoróforo. Los fluorocromos se utilizan para marcar ciertas estructuras celulares destacándolas del resto de los elementos que componen la célula. Esto permite identificar distintas moléculas o conjuntos de ellas. El fluorocromo puede presentar afinidad por distintos elementos celulares o puede ser conjugado químicamente a otras moléculas como anticuerpos, para reconocer específicamente cierto componente celular. En el microscopio de epifluorescencia convencional, la muestra se ilumina con un rango de longitudes de onda que se seleccionan mediante filtros de corte o interferenciales. La imagen obtenida es el resultado de la radiación emitida por las moléculas que han sido excitadas. Para detectar solo la emisión deseada, se utilizan unos determinados filtros. Se pueden observar muestras que previamente se han teñido con un fluoróforo o a las cuales se ha realizado una preparación inmunofluorescente o que sean intrínsecamente fluorescentes.

La microscopía de epifluorescencia convencional se empleó como método rutinario. Los equipos que se emplearon fueron el Zeiss Axiovert 200M y el ZOE Fluorescent Cell Imager (Bio-Rad Laboratories; ref. 1450031). El primero de ellos utiliza la luz procedente de una lámpara y mediante filtros selecciona la longitud de onda de excitación, en función del fluoróforo que se va a visualizar; en el segundo caso, el microscopio trabaja con LEDs y no emplea filtros.

Microscopía de fluorescencia confocal

La principal característica de la microscopía confocal de fluorescencia es que recoge y detecta la luz emitida por moléculas fluorescentes situadas en un mismo plano del espacio tridimensional. Esto es posible porque, por una parte, la fuente de iluminación utilizada es láser: radiación colimada en la que el haz se mantiene perfectamente lineal al propagarse. Esta luz monocromática ilumina las muestras de forma específica con una intensidad elevada y estable. Esta disposición permite conseguir resoluciones microscópicas subcelulares típicamente $\lambda/2$ (límite de difracción de Abbe), con λ la longitud de onda del láser. Por otra parte, en los microscopios confocales existe una pieza llamada “diafragma de detección confocal” o “*pinhole*”, un filtro espacial que consiste en un pequeño orificio en el filtro detector de la luz que impide el paso de aquella procedente de los planos de la muestra que no están en foco (Fig. 3.9). Así, se obtiene sólo la información de la región enfocada, denominada “plano de imagen primario” o “plano focal”, y se elimina el resto. Esta microscopía consigue obtener imágenes de alta resolución, nitidez y contraste en un

único plano focal de la muestra. Tras obtener varios planos focales a lo largo del eje Z, se puede generar una imagen 3D de la muestra.

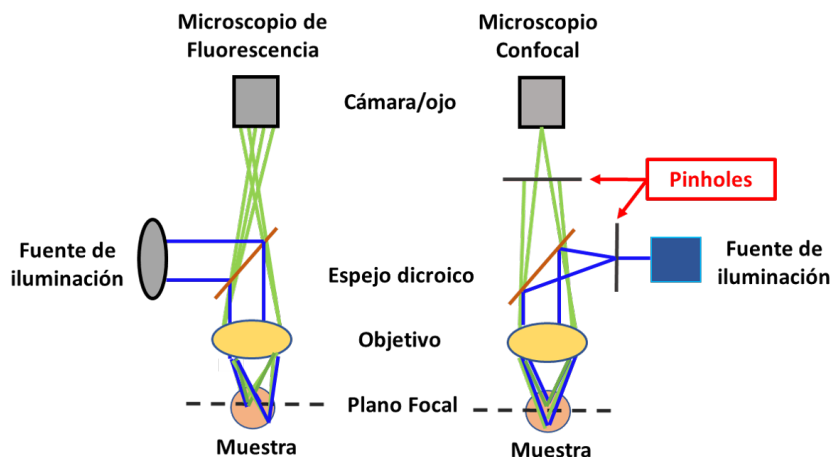


Figura 3.9: Diagrama donde se representan las diferencias entre la microscopía de fluorescencia y la microscopía de fluorescencia confocal.

El funcionamiento de un microscopio confocal es similar al de uno de epifluorescencia, ya que ambos se basan en el fenómeno de la fluorescencia. Una de las diferencias que existe entre ambos radica en que el segundo carece del “diafragma de detección confocal”, y utiliza una lámpara de mercurio y/o tungsteno halógena como fuente de iluminación. Esta lámpara tiene una potencia irregular, con diferentes picos de intensidad, que se podría definir como una combinación de diversas radiaciones monocromáticas. Por ello, proporciona imágenes de peor calidad, que muestran la información de todos los planos de la muestra, enfocados o no.

El microscopio confocal utilizado es un Nikon A1R equipado con varios láseres de longitudes de onda: 405, 488, 514, 561, 633 nm, y con dos sistemas de detección: por filtros en cuatro canales y espectral de 32 canales con tres redes de difracción diferentes. Se emplearon los objetivos de distintos aumentos y aperturas numéricas (NA): 10x (0,45 NA), 20x (0,75 NA), 60x (1,3 NA), 60x (1,4 NA), y 100x (1,49 NA), algunos de ellos (40x, 60x y 100x) de inmersión.

3.4.4. Inmunofluorescencia

Esta técnica se empleó para conocer la interacción y comportamiento de las SLPs en cultivos celulares, así como la visualización de la doxorubicina liberada de las partículas en función del tiempo. Se añadieron estas partículas cargadas con doxorubicina a una concentración de 2 $\mu\text{g/mL}$ a cultivos celulares B16-F10 (melanoma murino). Para ello, se cultivaron las células sobre cubreobjetos de borosilicato redondos de 10 mm de diámetro (Thermo Fisher). Se recogieron muestras a diferentes tiempos tras la adición de las partículas, se lavaron con PBS y posteriormente se fijaron incubando durante 20 minutos con paraformaldehído (ref. 43368; Alfa Aesar) al 4 % en PBS. Para poder distinguir la

interacción de las partículas con las células, las muestras fueron teñidas con el anticuerpo primario de ratón anti- α -tubulina (B512; Sigma-Aldrich) que reconoce los microtúbulos de la célula. Posteriormente, se le añadió un anticuerpo de cabra secundario, el anti-IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor 647 (ref.A21236; Invitrogen). La muestra se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con dichos anticuerpos por separado y realizando tres lavados entre ambos de 5 minutos cada uno con PBS-T (PBS con Tritón X-100) al 0,1 %. Para visualizar los núcleos se utilizó Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich). Para su almacenamiento, los cubreobjetos fijados se dejaron en una solución de PBS + 0,1 % de azida sódica (NaN_3) a 4 °C. Las muestras se montaron en medio Inmu-Mount (Thermo Fisher) sobre portamuestras (CellPath).

Para conocer la interacción de los liposomas y de las SLPs en cultivo celular, se añadieron estos nanosistemas a cultivos celulares de macrófagos de ratón (J774A.1). El procedimiento fue el mismo que se ha descrito anteriormente, a excepción del anticuerpo secundario empleado. En este caso se usó un anticuerpo de cabra secundario el anti-IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor 488 (ref.A11029; Invitrogen).

3.4.5. Microscopía de contraste de fases

La microscopía de contraste de fases es una técnica muy empleada en áreas como Medicina y Biología, ya que permite observar células y tejidos vivos, así como cortes semifinos no coloreados. Se usa principalmente para aumentar el contraste entre las partes claras y oscuras de las células sin colorear y resulta especialmente útil para células vivas. Para aumentar el contraste aprovecha las pequeñas diferencias de los índices de refracción en las distintas partes de una muestra. Esta microscopía se basa en que la luz, al atravesar objetos con distintos índices de refracción, experimenta retardos (o desfases); sin embargo, estos no son tan notorios como para poder observarlos. El microscopio de contraste de fases acentúa estos retardos, haciendo que zonas con distintos índices de refracción se traduzcan en una variación de contraste que puede ser observado. Las partes oscuras de la imagen corresponden a las partes densas de la muestra; las partes claras de la imagen corresponden a zonas menos densas. Esta técnica se empleó para el seguimiento rutinario de los cultivos celulares. Se usó un microscopio de contraste de fase Nikon Eclipse TS100F invertido equipado con una cámara digital Progress CT5 (Jenoptik).

3.4.6. Preparación de muestras celulares para microscopía electrónica de transmisión

Para analizar la internalización y la localización de las SLPs (con nanopartículas magnéticas [$\text{Fe}_3\text{O}_4@AO$]) en las células de macrófagos de ratón (J774A.1) y de melanoma murino (B16-F10) a diferentes tiempos (5, 24, 48 y 72 horas), se tomaron imágenes de microscopía electrónica. Las células a analizar se lavaron dos veces con solución HBSS, y se fijaron durante 30 minutos con glutaraldehído al 3 % en tampón fosfato 0.12 M (pH = 7,4). Para aumentar el contraste de las membranas celulares, se realizó una post-fijación durante 3 horas en OsO_4 (ref. 251755; Sigma-Aldrich) al 2 % a temperatura ambiente, en

agitación y protegido de la luz. Después de varias etapas de lavado con cloruro sódico a una concentración 0,1 M, la muestra se deshidrató en una serie gradual de acetona en agua (99.6 %, Labkem):

1. Acetona 30 %, 20 minutos
2. Acetona 50 %, 30 minutos
3. Acetona 70 % + acetato de uranilo 1 %, durante la noche
4. Acetona 80 %, 20 minutos
5. Acetona 90 %, 30 minutos
6. Acetona anhidra, 30 minutos (dos pasos)

Posteriormente la muestra se integró en una resina Durcupan (Fluka, ref. 44611 de Sigma- Aldrich) y la polimerización se llevó a cabo en una estufa a 65 °C durante 48 horas. Finalmente, los bloques se cortaron con un ultramicrotomo (Leica, Ultracut UCT). Se realizaron cortes semifinos de 1 μm de espesor que se tiñeron con azul de toluidina al 1 % para valorar la correcta preservación del material. Los cortes ultrafinos de 60 nm se montaron en rejillas de níquel y se tiñeron con acetato de uranilo antes de su visualización. Los cortes se realizaron en el ultramicrotomo Leica®. El microscopio electrónico utilizado para el análisis de las muestras fue un JEOL JEM 1011 equipado con una cámara digital Gatan de alta resolución disponible en el IDIVAL. Esta técnica se llevó a cabo con la colaboración de Débora Muñoz, técnico del grupo de Nanomedicina.

3.4.7. Viabilidad celular

El ensayo de viabilidad celular pretende determinar la cantidad de células no viables (células muertas con la membrana dañada) en un cultivo celular tras aplicarle un determinado tratamiento (fármaco o partículas). El ensayo de exclusión de azul de tripán es uno de los métodos más comunes para medir la viabilidad celular. El azul de tripán, también conocido como diamina azul y azul Niágara, es una diamina derivada de la toluidina. Este colorante es una molécula de 960 Da que no es capaz de atravesar la membrana celular y, por lo tanto, sólo consigue teñir las células con la membrana dañada. Al entrar en la célula, el azul de tripán se une a las proteínas intracelulares, lo que hace que las células adquieran un color azulado. Por lo tanto, las células muertas se muestran de un distintivo color azul bajo el microscopio. Debido a que las células vivas excluyen al colorante y no se tiñen, este método también se llama método de tinción por exclusión.

El experimento se realizó cultivando macrófagos murinos (J774A.1) en una placa de 6 pocillos con medio IMDM, suplementado con SBF al 10 %. Tras 72 horas de exposición a los diferentes tratamientos, se extrajeron las células, se mezclaron con el azul de tripán en una proporción 1:1 y se contaron en una cámara de Neubauer (Ref.717820; BrandTM; Fisher Scientific) al microscopio. Se realizó un conteo de las no viables (teñidas de azul) respecto al número total de células en cada tratamiento.

3.5. *Listeria monocytogenes* 10403S como modelo de bacteria intracelular

3.5.1. Cepa bacteriana

El modelo bacteriano de microorganismo intracelular empleado en esta Tesis es la *Listeria monocytogenes*: se empleó la cepa silvestre 10403S fluorescente cedida por el Dr. Daniel A. Portnoy (University of California, Berkeley, USA). Esta cepa tiene la peculiaridad de presentar fluorescencia, generada por un plásmido de expresión constitutivo de mCherry [349–351].

3.5.2. Soluciones

Los medios líquidos o soluciones que se emplearon en el crecimiento y mantenimiento de los cultivos bacterianos fueron los siguientes:

BHI: del inglés *Brain-Heart Infusion*. Se trata de un medio de alto valor nutritivo empleado para el crecimiento de un amplio rango de microorganismos (aerobios y anaerobios). Formulación para 1 litro: 17,5 g de infusión de cerebro y corazón de cerdo, 10 g de peptona, 2 g de glucosa, 5 g de NaCl y 2,5 g de Na₂HPO₄ disuelto en 1 litro de agua ultrapura y esterilizado en autoclave a 121 °C durante 20 minutos; pH final: 7,4. Biokar, (ref. BK015HA).

BHI-agar: medio BHI al que se le ha añadido 1,5 % de agar para el crecimiento de microorganismos en medio sólido. Biokar, (ref. BK029HA).

PBST 0,1 %: solución de tampón fosfato salino al que se le ha añadido un 0,1 % de tritón X-100, un surfactante no iónico empleado para la lisis celular y para la permeabilización de las células en técnicas de tinción o inmunofluorescencia. Sigma-Aldrich, (ref. X100-100ML).

Estreptomicina: antibiótico empleado en el cultivo de la bacteria *L. monocytogenes* por ser el antibiótico al que presenta resistencia dicha cepa. Se preparó un stock del antibiótico Estreptomicina (ref. S9137; Sigma-Aldrich) en una solución en agua a una concentración de 50 mg/mL y se conservó a -20 °C. La concentración de uso fue de 50 µg/mL.

3.5.3. Preparación de stock de bacterias

Inicialmente se tomó una pequeña muestra del glicerol previamente preparado y conservado a -80 °C, se preparó un preinóculo de caldo de cultivo BHI y estreptomicina a una concentración de 50 µg/mL y se dejó crecer durante la noche a 37 °C. Tras 12 horas de crecimiento bacteriano, se preparó un tubo con 5 mL de caldo de cultivo BHI y glicerol anhidro al 20 % (ref. A1123; Panreac) y se tomó una pequeña muestra del cultivo crecido del preinóculo hasta que apareció turbidez. A continuación, se agitó bien la muestra y se midió la densidad óptica de la muestra a 600 nm. La cuantificación bacteriana se llevó a cabo empleando las unidades formadoras de colonias (UFCs/mL). Una UFC es una unidad de medida que se emplea para la cuantificación de microorganismos viables en

una muestra líquida o sólida. La viabilidad se define como la habilidad de multiplicarse por fisión binaria en condiciones controladas. Por lo tanto, en el recuento de UFCs de un cultivo de microorganismos solo se consideran las células viables. Las UFCs son el número mínimo de células separables sobre la superficie o dentro de un medio de agar semisólido, que da lugar al desarrollo de una colonia visible. Se considera una absorbancia de 1.0 aproximadamente a unas 10^8 unidades formadoras de colonias (UFCs)/mL. Para corroborar esto, en paralelo se prepararon unas diluciones seriadas de la muestra. Se plaquearon en placas de Petri con medio BHI-agar las tres últimas diluciones (10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7}), tres placas de cada dilución y se incubaron durante 24-48 horas a 37 °C. Cuando se observó crecimiento se cuantificó el número de UFCs/mL y se conservó la muestra de concentración conocida a -20 °C.

3.5.4. Diseño de infección intracelular con *L. monocytogenes*

Las células J774 se cultivaron a 37 °C en placas de 6 pocillos hasta alcanzar una cantidad aproximada de 10^6 células/pocillo, usando como medio de cultivo IMDM suplementado con un 10 % de SBF y 50 µg/mL de gentamicina, en un volumen de 2 mL/pocillo. Posteriormente, las células permanecieron en medio IMDM sin antibiótico. A continuación, se añadieron las bacterias *L. monocytogenes* a una concentración necesaria para obtener una infección 1:30 (30 bacterias/célula) y se mantuvo a 37 °C en estufa con una atmósfera de CO₂ al 5 % y una humedad relativa del 95 % durante 3 horas. Tras este tiempo, el medio se cambió por IMDM con gentamicina a una concentración de 500 µg/mL, con el fin de eliminar las bacterias extracelulares que no se hubieran internalizado. Después, dicho medio fue sustituido por IMDM con gentamicina a una concentración de 50 µg/mL y se añadieron las nanopartículas con el tratamiento según los grupos del experimento, hasta las 72 horas.

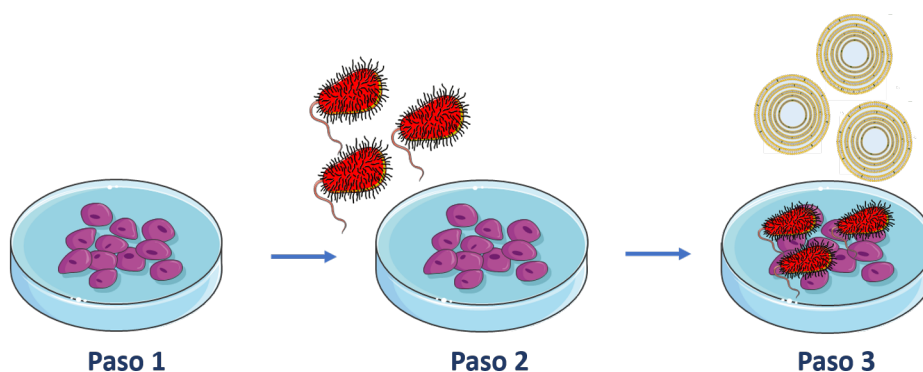


Figura 3.10: Diseño de infección de macrófagos con la bacteria intracelular modelo: *Listeria monocytogenes*. La infección se llevó a cabo siguiendo los pasos: Paso 1, se cultivan las células, en este caso los macrófagos murinos. A continuación, el paso 2 consistió en infectar dichas células con *L. monocytogenes*, una vez estuvieron las células infectadas con la bacteria en su interior (paso 3) y tras eliminar las bacterias extracelulares, se añadieron a estos cultivos procariota-eucariota las partículas (SLPs y liposomas) cargadas con los fármacos (enrofloxacina y cloranfenicol) junto con los respectivos controles para conocer su eficacia terapéutica.

3.5.5. Extracción de bacteria *L. monocytogenes* y cuantificación de unidades formadoras de colonias.

Posteriormente, para conocer si el tratamiento fue efectivo, las células fueron lavadas dos veces con PBS, y por último, para facilitar la lisis celular y liberar las bacterias que contengan las células, al medio se le añadió PBST (PBS con un 0,1 % de tritón). Una vez lisadas, se centrifugaron a 12.000 g durante 10 minutos, se añadieron 200 μ L de medio BHI y se cultivaron en placas de BHI-agar con estreptomicina siguiendo diferentes diluciones. Se incubaron en estufa a 37 °C durante 24-48 horas y se cuantificaron el número de bacterias viables como unidades formadoras de colonias (UFCs).

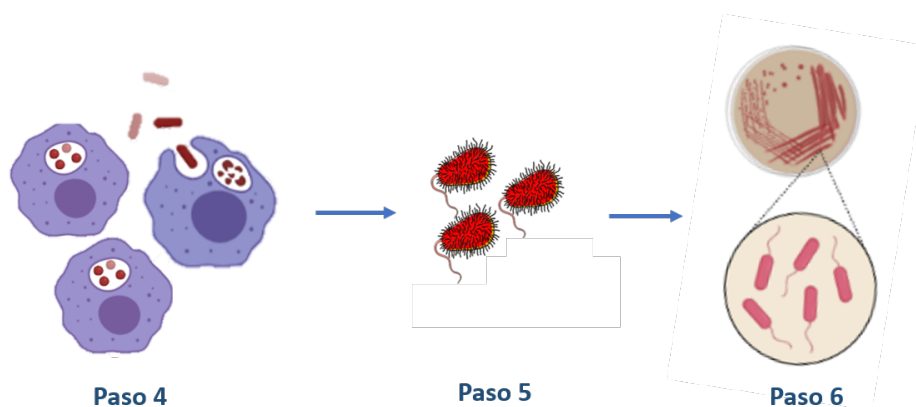


Figura 3.11: Esquema de extracción de la bacteria intracelular y posterior cuantificación de UFCs/mL. La extracción se llevó a cabo siguiendo los pasos: Paso 4, se lavan las células infectadas y posteriormente son lisadas para extraer la bacteria intracelular (*L. monocytogenes*). Una vez se ha extraído la bacteria intracelular (paso 5), se cultivan dichas bacterias en medio BHI-agar durante 24-48 horas. Por último (paso 6), se observa si ha habido crecimiento de colonias y se cuantifican dichas colonias como UFCs/mL.

3.6. Ensayos *in vivo* en modelos murinos

3.6.1. Modelo animal

Los experimentos se realizaron empleando los ratones de la cepa C57BL/6: cepa murina congénita. Dichos animales se obtuvieron de la empresa Charles River (Saint-Germain-sur-l'Arbresle, Francia) y del Servicio de Estabulación y Experimentación Animal (SEEA) de la Universidad de Cantabria, siendo estabulados en las instalaciones de este último bajo el cuidado de personal autorizado.

Se diseñaron y realizaron experimentos *in vivo* para minimizar el uso de animales. Los C57BL/6 (12-16 semanas de edad) fueron alojados con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas con suministro de comida y agua. Los animales se mantuvieron, manipularon y sacrificaron siguiendo todas las directivas europea (2010/63/UE), española vigente (Real Decreto 53/2013) y siguiendo los procedimientos aprobados por el Comité de Bioética de la

Universidad de Cantabria. Todos los experimentos se llevaron a cabo bajo el amparo jurídico y los permisos concedidos al proyecto MINECO-ISCI (PI16/000496 y PI19/00349).

3.6.2. Modelo tumoral

El modelo de metástasis pulmonar B16-F10 en la cepa de ratones C57BL/6 está bien establecido en la literatura [352–354]. Esta línea celular deriva de un melanoma espontáneo que se desarrolló en ratones C57BL/6. Para producir las metástasis se inyectaron por el seno retro-orbital 10^5 células de melanoma murino (B16-F10) en 50 μ L de medio de cultivo que contenía antibióticos, utilizando una microjeringa de 0,3 mL (BD Microfine-Fine™). Los ratones fueron sacrificados 20 días después del trasplante y se recogieron los órganos (Fig. 3.12). Posteriormente, se fijaron en formalina (ref. HT501128; Sigma-Aldrich) para su estudio. Las colonias metastásicas se reconocieron fácilmente como puntos negros en la superficie del pulmón (Fig. 3.13).

Declaración ética: todos los experimentos ejecutados en animales se han realizado de acuerdo con el Real Decreto 53/2013 de la legislación española (B.O.E., 2013), la directiva 2010/63/UE de la europea (D.O.U.E., 2010), evitando siempre en la medida de lo posible el sufrimiento innecesario del animal en cualquier procedimiento. Los protocolos empleados han sido aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Cantabria (Permiso 2012/06), visto bueno renovado en 2017 (Permiso PI-01-17).

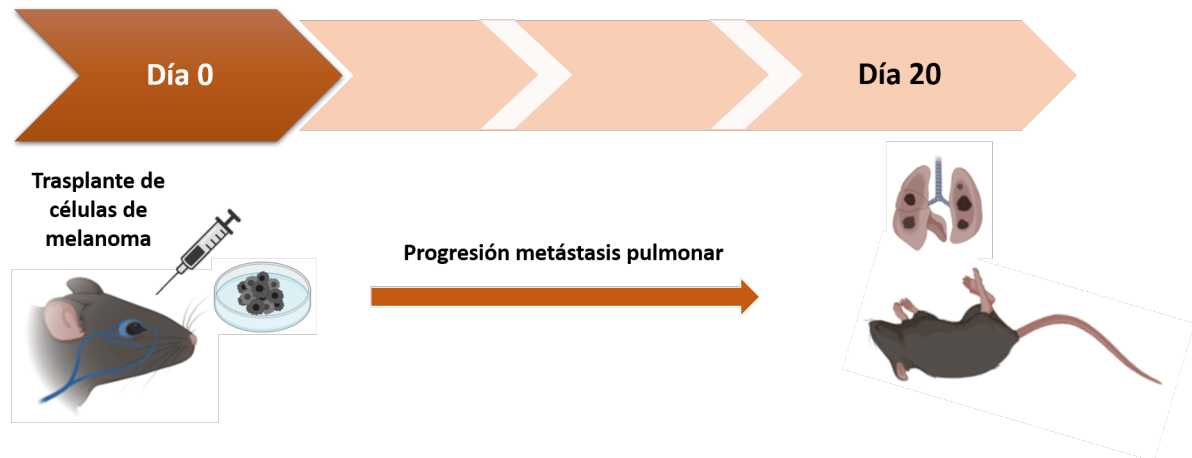


Figura 3.12: Desarrollo del modelo de metástasis pulmonares en ratón.

3.6.3. Inhibición del crecimiento tumoral en pulmones

Para conocer la capacidad de inhibición tumoral que presenta la doxorrubicina encapsulada en SLPs, se generó en un primer momento el modelo tumoral de melanoma descrito en el punto anterior. A los diez días después de la inyección intravenosa de células cancerosas, los ratones trasplantados se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos para ser tratados de la siguiente manera: control sin tratar, inyectados con la doxorrubicina en solución, inyectados con partículas y, finalmente, inyectados con partículas cargadas con

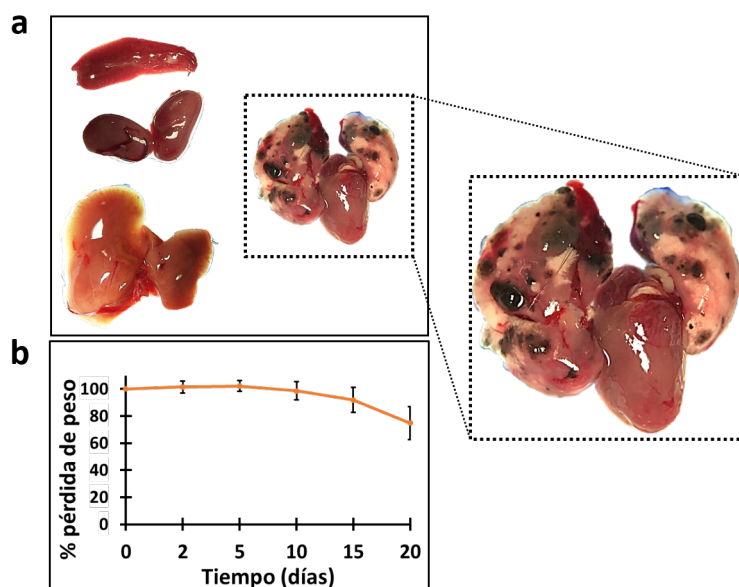


Figura 3.13: a) Imagen de los órganos del ratón tras 20 días post-inyección de células de melanoma. Se aprecian metástasis superficiales de color negro solo en pulmón. b) Seguimiento de la disminución del peso de los ratones durante el experimento tras habérseles administrado un alotrasplante de células de melanoma por vía intravenosa (N=7).

doxorrubicina. Los animales se trataron 3 veces cada 2 días a una concentración final de 2,5 mg/kg de doxorrubicina cada dosis. Los ratones fueron sacrificados 20 días después del alotrasplante celular. Los órganos se fijaron en formalina 10 % para su posterior estudio histopatológico.

3.6.4. Supresión de la formación de cáncer metastásico en pulmones

El diseño de este segundo experimento se centró en la supresión de la formación de metástasis pulmonar mediante el tratamiento con doxorrubicina encapsulada en SLPs. Para ello, se empleó el mismo modelo tumoral que se ha indicado anteriormente (Sección 3.6.2 de Materiales y Métodos). En este estudio, el tratamiento consistió en tres dosis, pero la primera de ellas se administró en el mismo momento que el trasplante de células de melanoma murino (B16-F10). A continuación, se administraron las dos dosis restantes a día 2 y 4 tras el día del trasplante celular. Tras 20 días de experimento los ratones se sacrificaron y los órganos se fijaron en formalina para su posterior estudio.

3.6.5. Cortes y tinción de hematoxilina-eosina de pulmones metastásicos

La tinción de hematoxilina-eosina es una técnica de coloración que utiliza la combinación de dos colorantes. En este sentido, la hematoxilina es considerada un colorante básico

(catiónico) y por ello presenta afinidad por las estructuras ácidas, tiñendo principalmente los núcleos de las células, ya que estos son muy ricos en ácidos nucleicos. También puede teñir inclusiones citoplasmáticas de origen viral. Por otro lado, la eosina, al ser un colorante ácido (aniónico), tiene afinidad por las estructuras alcalinas o básicas tiñendo citoplasmas, fibras musculares, organelos citoplasmáticos y colágeno, pero no los núcleos celulares. Por esta razón, esta combinación de colorantes es muy utilizada para la tinción de tejidos, pues permite distinguir claramente los núcleos y los citoplasmas. Los núcleos se tiñen de color azul oscuro o púrpura y el citoplasma de color rosado. La tinción hematoxilina-eosina es una de las técnicas de coloración más utilizadas en el área de histología y citología, por su fácil manejo y bajo coste. Se utiliza para la visualización de células, fibras nerviosas gruesas y la presencia de ciertos microorganismos en los tejidos, tales como: parásitos, hongos y bacterias, entre otros.

La evaluación histopatológica se realizó en secciones de tejido pulmonar embebidos en parafina y cortados por microtomo en la unidad de Anatomía Patológica del Hospital Marqués de Valdecilla. Tanto los cortes como la posterior tinción con hematoxilina-eosina fueron llevados a cabo por Débora Muñoz, técnico del grupo de Nanomedicina y de Begoña Ubilla, técnico de la unidad de Anatomía Patológica del hospital Marqués de Valdecilla. La tinción de cortes histológicos pasa por una serie de pasos resumidos en la Figura 3.14. El primer paso del proceso es la obtención del corte histológico. Este debe ser parafinado para luego obtener los cortes (ultra-finos) con un microtomo. Una vez se obtienen los cortes, la técnica de tinción consta de los siguientes pasos:

1. Eliminación del exceso de parafina: para ello se sumerge la muestras en xilol (ref. 28.975.360; VWR) durante 10 minutos.
2. Rehidratación de la muestra: para ello, la muestra es sumergida en distintas concentraciones de alcoholes (etanol) en orden descendente (100 %, 90 %, 70 %). En todos los casos durante 10 minutos.
3. Eliminación del exceso de alcohol: para ello se introduce la muestra en agua destilada durante 10 minutos.
4. Coloración con hematoxilina (ref. 1.09249.0500; Merck): la muestra se sumerge durante 6-10 minutos en una solución de hematoxilina.
5. Eliminación del exceso de hematoxilina: se lava con agua sin tratar durante 15 minutos, a continuación la muestra se introduce en agua destilada durante 10 minutos.
6. Coloración con eosina (ref. 256879; Panreac): para ello se sumerge la muestra durante 30 segundos en la bandeja de eosina.
7. Deshidratación de la muestra: para ello se vuelve a pasar por las soluciones de alcoholes (etanol), pero esta vez en orden ascendente. (80 %, 96 %, 100 %). (Por 15 segundos, 30 segundos, 15 minutos, respectivamente).
8. Clarificación de la muestra: finalmente la muestra se introduce en xilol por 5-10 minutos, se seca y se monta para su posterior observación.

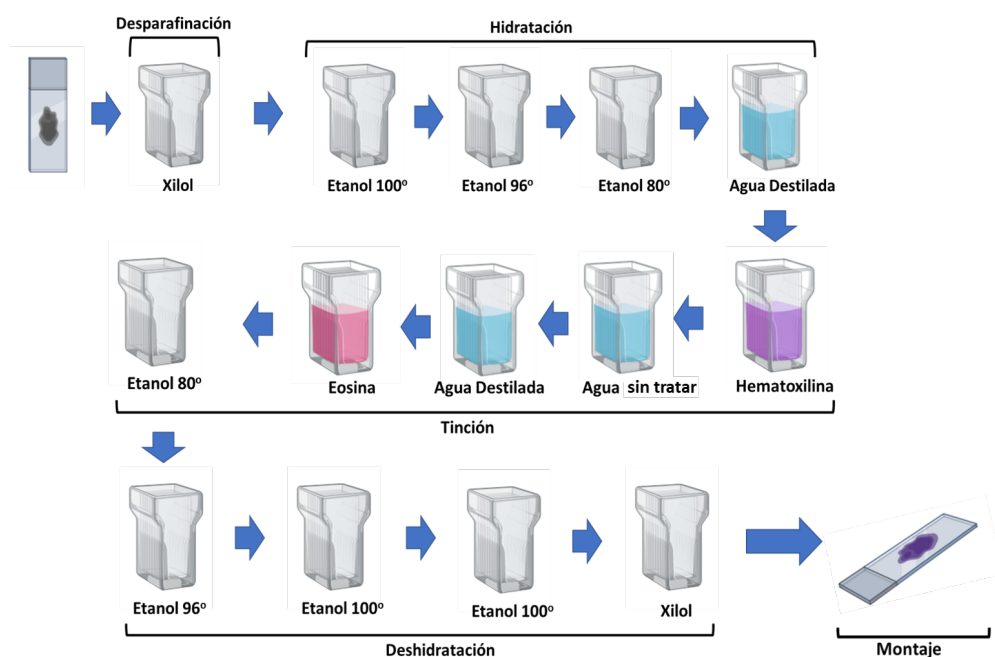


Figura 3.14: Proceso de tinción de muestras con hematoxilina y eosina

3.6.6. Cuantificación del área pulmonar afectada por metástasis

Para poder cuantificar las metástasis superficiales presentes en los pulmones de los ratones tras el experimento, se utilizó el programa ImageJ (Fig.3.15). Tras sacrificar a los ratones y extraer los pulmones, se realizaron fotos por ambas caras de los órganos sin fijar empleando la lupa binocular (Stemi 508, Zeiss). Las imágenes digitalizadas fueron editadas con el programa ImageJ 1.48v donde las áreas metastásicas (píxeles) fueron cuantificadas frente al área total del pulmón (se cuantificaron ambas caras del pulmón por separado).

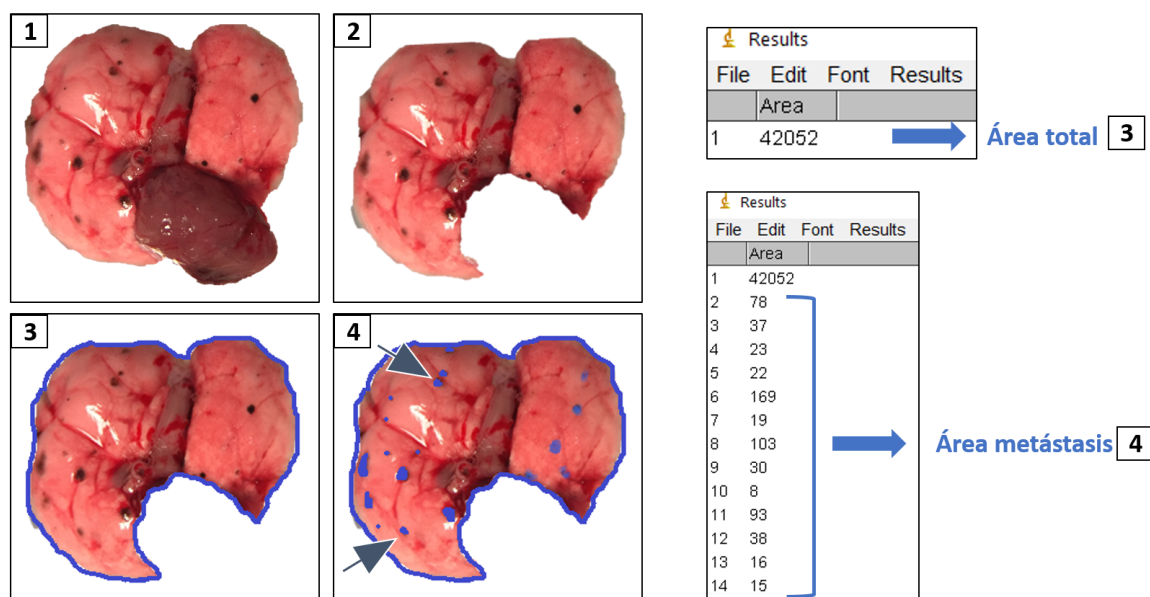


Figura 3.15: Método de estimación cuantitativa de metástasis en pulmones de ratón.

3.6.7. Biodistribución de las partículas sólidas lipídicas con nanopartículas de óxido de hierro

Las nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO$ que se encuentran embebidas en las SLPs permitieron determinar la distribución de las nanopartículas en los diferentes tejidos mediante espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES). Mediante la técnica ICP-OES, los átomos en su estado fundamental son excitados a estados energéticos superiores denominados estados excitados. Dichos átomos o iones excitados son inestables y tienden a volver a su estado fundamental, devolviendo la energía absorbida en forma de radiaciones electromagnéticas de longitudes de onda características. Las frecuencias de las radiaciones emitidas están relacionadas directamente con la configuración electrónica y con la energía que proporciona la fuente de excitación. Cada elemento, por tanto, produce un conjunto de radiaciones a longitudes de onda fijas (líneas atómicas) que constituyen su espectro atómico característico. La intensidad de la radiación, que es proporcional a la concentración del elemento en la muestra, se estima mediante curvas de calibración, obteniendo así la concentración para cada elemento. La espectrometría de emisión ICP permite determinar concentraciones de elementos en una muestra del orden de ppb (partes por billón). Para ello, se recolectaron tejidos para un total de 4 ratones por grupo, se fijaron en formalina, se pesaron y calcinaron a $450\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 12 horas para eliminar toda la materia orgánica. Las cenizas obtenidas se dispersaron en ácido clorhídrico concentrado (HCl 37 %) durante la noche. Finalmente, las muestras se diluyeron a 10 mL con agua milli-Q y se analizaron mediante ICP-OES.

El equipo usado para determinar la cantidad de hierro presente en las diferentes muestras fue un ICPE-9000 de SHIMADZU (en el Laboratorio Ibérico Internacional de Nanotecnología, INL). Para conocer la concentración de cada elemento se realizaron rectas de calibrado con patrones de concentración conocida (TraceCERT®, 1000 mg/L Fe, ref. 43149 y TraceCERT®, 33 elements, 10 mg/L, ref. 92091, Sigma-Aldrich). Estas medidas fueron realizadas por la Dra. Lorena García Hevia y el Dr. Juan Gallo.

3.7. Análisis de resultados

Para los estudios estadísticos en los que se analizaron diferencias entre dos poblaciones, se utilizó el test de la *t de Student*. Las diferencias fueron consideradas no significativas cuando $p \geq 0,05$, significativas cuando $p < 0,001$ (*), cuando $p < 0,005$ (**) y cuando $p < 0,01$ (***). Estos análisis se llevaron a cabo empleando el programa informático Origin 2018.

En el análisis de distribución de tamaños de las nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO$, se utilizó el Programa ImageJ, con la herramienta Image Tool, mediante el cual se midió el diámetro de más de 100 nanopartículas obteniendo el valor medio y su desviación estándar. El histograma de la distribución se realizó con el programa Origin 2018. Para el diseño de los gráficos se empleó el programa Biorender (www.biorender.com).

Resultados y Discusión

4.1. Tratamiento frente a cáncer metastásico

En los últimos años, se ha observado un esfuerzo considerable en el campo de la oncología por la detección precoz, el empleo de terapias combinadas y por detener el crecimiento del cáncer. Actualmente, los pacientes con metástasis avanzada tienen una probabilidad baja de recuperación porque no existen tratamientos para detener o prevenir este proceso. Las formas farmacéuticas convencionales y sus métodos de producción tienen varias limitaciones, como pautas de dosificación frecuentes, escasa biodisponibilidad o una falta de cumplimiento por parte del paciente [355]. Estas formulaciones están diseñadas de tal manera que la concentración terapéutica del fármaco debe estar siempre dentro de la ventana terapéutica, mientras se intenta evitar los efectos tóxicos que se producen por una sobredosis [356]. Para ello, es fundamental estudiar el nivel de concentración del fármaco en sangre. Por un lado, una dosis única del fármaco podría provocar efectos secundarios tóxicos. Por otro lado, dosis menores administradas en diferentes momentos pueden mantener la concentración del fármaco en plasma, pero pudiendo producir una respuesta ineficaz desde el punto de vista clínico. Por lo tanto, una posible solución podría ser una administración dirigida y prolongada en el tiempo, permitiendo una menor concentración de fármaco en circulación. En este escenario, los sistemas nanotransportadores de fármacos pueden hacer una contribución significativa. Los beneficios de tales sistemas de administración son: (i) una menor frecuencia de dosificación determinada por un control en la liberación del fármaco desde la matriz que conforma el nanosistema, (ii) una mayor biodisponibilidad del fármaco, (iii) una estabilidad mejorada del fármaco, (iv) una menor toxicidad del fármaco en regímenes terapéuticos de tipo crónico y repetitivo, y (v) la reducción de la pérdida brusca de fármaco por un proceso de eliminación continua [357]. En este contexto, existen numerosos tipos de nanotransportadores de fármacos, pero también existen muchos problemas asociados con ellos: toxicidad, baja eficiencia de encapsulación, falta de estabilidad del fármaco, incapacidad para encapsular más de un fármaco o liberación rápida e ineficaz. En esta Tesis Doctoral se propone el uso de SLPs como sistema de transporte de la doxorubicina debido a las diferentes propiedades que se han ido mencionando a lo largo

del trabajo y que condicionan su uso en clínica. Algunas de estas propiedades son: una amplia distribución, falta de especificidad y aparición de efectos adversos a dosis altas.

4.1.1. Síntesis de las partículas sólidas lipídicas

Las partículas sólidas lipídicas (SLPs) se sintetizaron siguiendo el proceso de fusión-emulsión modificado descrito en la Sección de Materiales y Métodos (Fig. 3.2). La síntesis de las SLPs se realizó mediante una colaboración con el laboratorio del Dr. Manuel Bañobre en el Instituto Ibérico Internacional de Nanotecnología (INL) de Braga, Portugal. La técnica fue realizada por la Dra. Lorena García-Hevia. Este método es uno de los más empleados y presenta ciertas ventajas con respecto a otros métodos de síntesis de estas SLPs. Una de las ventajas es que no requiere de equipos complejos, y no emplea grandes cantidades de disolventes orgánicos en su síntesis. No presenta los inconvenientes que sí ocurren con otras técnicas de síntesis en las cuales el disolvente no se elimina del todo, quedando residuos dentro de la partícula que pueden generar efectos tóxicos en futuros ensayos *in vitro* e *in vivo*. Otra de las ventajas que presenta esta técnica es que se consiguen niveles de encapsulación de sustancias hidrofóbicas altos, con respecto a otros métodos. Por otro lado, la cantidad de tensioactivo empleada en esta técnica no es demasiado alta y controlando las condiciones de síntesis es posible modificar las características finales de la suspensión de las partículas.

En cuanto a los componentes empleados, de entre los lípidos sólidos disponibles para sintetizar estas partículas lipídicas se escogió un lípido natural (cera de *Carnauba*) (Fig. 4.1). La cera de *Carnauba*, también llamada de Brasil, está presente en las hojas de la palma, *Copernicia prunifera*, una planta nativa y cultivada en este país. Tiene un punto de fusión de 82 - 86 °C, siendo una de las ceras naturales más duras por presentar el punto de fusión más alto, indicando que el enlace entre las moléculas que lo forman es bastante fuerte [358, 359]. El uso de este compuesto (como matriz de la partícula) tiene beneficios tales como su bajo coste y la facilidad de fabricación. Las ventajas de las ceras incluyen una buena estabilidad a niveles variables de pH y humedad. Se ha demostrado que actúa como sistema de liberación sostenida para una variedad de medicamentos debido a su dureza e hidrofobicidad [360, 361]. Además, es ampliamente utilizada en la industria de la alimentación [357] y presenta aplicaciones farmacéuticas entre otras tecnologías. Por todas estas características se pensó que sería una buena elección para la fabricación de las SLPs. Por otro lado, la elección del surfactante (Tween o polisorbato 80) también presenta ventajas frente a otros tensioactivos, ya que este surfactante no iónico es uno de los más empleados en la industria cosmética o en la formulación magistral, no presenta toxicidad y su empleo abarca desde preparados de administración parenteral hasta oral o tópica [362, 363]. El diseño de estas SLPs presenta un perfil biodegradable y biocompatible [62], además de una alta encapsulación y una liberación sostenida [80], convirtiendo a estas SLPs en unas buenas candidatas como transportadoras de fármacos.

Esta matriz orgánica hidrófoba (Fig. 4.1) contiene en su interior nanopartículas de Fe₃O₄@AO y un colorante fluorescente (DiO). Las nanopartículas de Fe₃O₄@AO sintetizadas de un tamaño medio de unos ≈ 13 nm por el método de co-precipitación detallado en la (Sección 3.1.1 de Materiales y Métodos [Fig. 3.1]), se añadieron a la síntesis

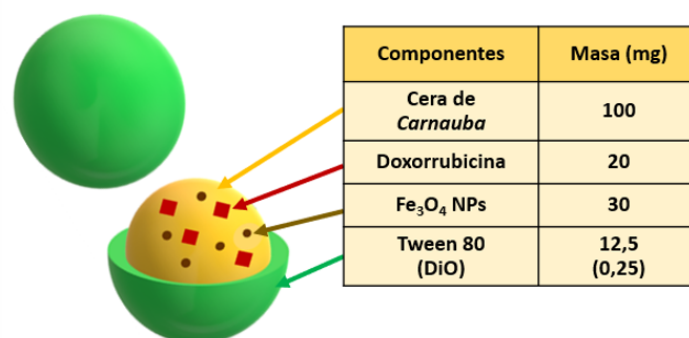


Figura 4.1: Esquema de las SLPs cargadas con doxorubicina sintetizadas por el método de fusión-emulsión modificado con las cantidades de los componentes añadidos en la síntesis.

de las SLPs para estudios de la distribución *in vivo* que se explicarán más adelante. El colorante fluorescente (DiO) se añadió para fines de detección e imagen. Las SLPs se marcaron con este colorante lipofílico, ampliamente utilizado debido a su biocompatibilidad y gran estabilidad en tejidos vivos y fijados [364]. El DiO permite la localización de partículas mediante tecnologías de microfluorescencia en células y tejidos procesados. Por último, las partículas se cargaron con un 20 % (p/p) (Fig. 4.1) del fármaco elegido en este trabajo, es decir, la doxorubicina. Este fármaco de la familia de las antraciclinas presenta inconvenientes para su uso en clínica por sus efectos secundarios, por ello se eligió, para encapsularlo dentro de estas SLPs y poder demostrar si un sistema de administración de fármacos basado en lípidos puede disminuir la toxicidad y mejorar el efecto antineoplásico del fármaco encapsulado con respecto al fármaco administrado de manera convencional.

4.1.2. Caracterización de las partículas sólidas lipídicas

Potencial zeta y tamaño

La caracterización de las SLPs sintetizadas se realizó en el laboratorio del Dr. Manuel Bañobre en el Instituto Ibérico Internacional de Nanotecnología (INL). La técnica fue llevada a cabo por la Dra. Lorena García-Hevia. Las partículas presentaron un valor de potencial ζ estimado de -10 mV y +23 mV para los SLPs control (sin carga de fármaco) y SLPs cargadas con doxorubicina (SLPs-DOX), respectivamente (Fig. 4.2). Este cambio en la carga superficial de las partículas se puede explicar debido a la carga positiva de la doxorubicina a pH fisiológico y nos indica que tras el proceso de síntesis, parte de la doxorubicina se ha quedado adsorbida en la superficie de la partícula, probablemente debido a la atracción electrostática entre las partículas (cargadas negativamente debido a la cera) y el fármaco con carga positiva. Esta hipótesis hace referencia a cómo la medición del potencial zeta (Sección 3.2.1 de Materiales y Métodos) puede aportar información de dónde se puede encontrar el fármaco tras el proceso de síntesis, si parte del compuesto a encapsular (en este caso la doxorubicina) puede quedar adherido a la superficie de la partícula o no. En cuanto al tamaño medio medido por la técnica de DLS, las partículas presentaron un diámetro hidrodinámico de aprox. 200 nm, este tamaño no varió significativamente si se comparan las partículas cargadas con doxorubicina de las partículas control (Fig. 4.2). Este tamaño de partícula era el esperado según el método de síntesis empleado [86].

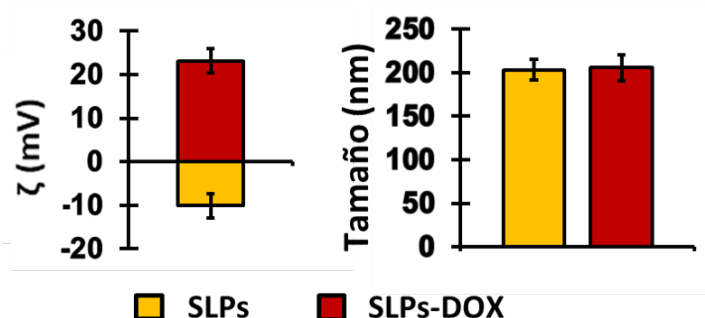


Figura 4.2: Medidas de potencial zeta (izquierda) y de tamaño (derecha) de las SLPs cargadas con doxorubicina (rojo) frente a las SLPs control (amarillo).

Microscopía electrónica de transmisión (TEM) y de barrido (SEM)

Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) mostraron que la morfología de las partículas sintetizadas presentaban una forma cuasi-esférica. Esta técnica de microscopía permitió identificar las nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@AO$ embebidas en el interior de la matriz de cera debido a su diferente densidad electrónica, como puede observarse en la Figura 4.3. Las muestras de las SLPs también fueron observadas por microscopía electrónica de barrido (SEM) donde se apreció esta morfología redondeada, anteriormente mencionada, característica de estas partículas. Ambas técnicas de microscopía fueron realizadas por la Dra. Lorena García-Hevia en el grupo del Dr. Manuel Bañobre en el Instituto Ibérico Internacional de Nanotecnología (INL).

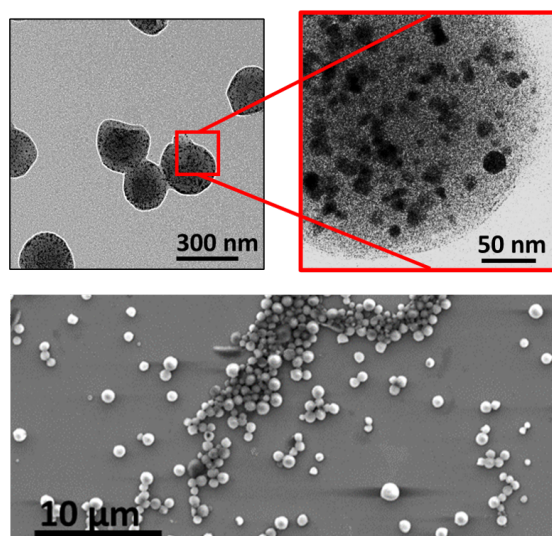


Figura 4.3: Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (arriba) y de barrido (abajo) de las SLPs sintetizadas.

4.1.3. Eficiencia de encapsulación y perfil de liberación de las SLPs cargadas con doxorrubicina.

Eficiencia de encapsulación de la doxorrubicina

Para medir la encapsulación de la doxorrubicina en las SLPs se empleó un equipo de HPLC. Dicho equipo se encuentra en el laboratorio del Dr. Manuel Bañobre en el Instituto Ibérico Internacional de Nanotecnología (INL). La técnica fue llevada a cabo por la Dra. Lorena García-Hevia y el Dr. Juan Gallo. La estimación se realizó mediante un proceso indirecto, midiendo la cantidad de fármaco no encapsulado frente al total. Tras la determinación de dicha cantidad y empleando la ecuación de eficiencia de encapsulación (E.E. %) (Sección 3.3.3 de Materiales y Métodos), se determinó que fue de $86,5 \pm 1,4$. Este dato indica una alta carga de fármaco, que es uno de los objetivos que se pretende alcanzar en la síntesis de las SLPs, ya que si se consigue una alta encapsulación de fármaco, permite el uso de una menor cantidad de partículas en los experimentos posteriores.

Esta alta encapsulación era la esperada según otros estudios realizados previamente [86], ya que en el proceso de síntesis empleado, la fase oleosa, en este caso la cera de *Carnauba* y el fármaco, son derretidos formando una solución previa al proceso de homogeneización como ya se ha comentado anteriormente en la Sección 4.1.1 de Resultados. Si el fármaco tiene naturaleza lipofílica, la afinidad de este por la fase oleosa (cera) es alta, por lo que se mejora, la posterior encapsulación del mismo en las SLPs [365]. En cuanto a la estabilidad del fármaco durante el proceso de síntesis, y con el fin de evitar una degradación del mismo durante dicho proceso, el fármaco es expuesto a altas temperaturas durante un espacio de tiempo corto (≈ 3 minutos) y una vez terminada la fase de sonicación, es enfriado rápidamente. Esta metodología permitió encapsular el fármaco de forma eficiente y aparentemente sin mostrar degradación, ya que en estudios posteriores se demuestra su efectividad terapéutica.

Ensayo de liberación *in vitro*

Recta de calibrado de la doxorrubicina

Para poder estimar la cantidad de doxorrubicina liberada en las SLPs y antes de comenzar con el estudio del perfil de liberación, se realizó una recta patrón de calibrado empleando diferentes disoluciones de concentración conocida de doxorrubicina en el mismo medio en el que se realizó el ensayo *in vitro* de liberación (PBS). La recta patrón y la posterior cuantificación se realizó mediante fluorimetría, ya que la doxorrubicina presenta la característica de emitir fluorescencia a $\lambda_{em} = 590$ nm cuando se excita a una longitud de onda de $\lambda_{exc} = 480$ nm (Fig. 3.8). En paralelo se realizaron las mismas medidas, pero esta vez empleando la técnica de Espectroscopía UV-Visible, técnica común en la cuantificación de fármacos. En este caso la recta de calibrado de la doxorrubicina en PBS se realizó a la longitud de onda del máximo de absorbancia del fármaco ($\lambda_{max} = 488$ nm). En las Figuras 4.4 y 4.5 se muestran ambas rectas representadas con los correspondientes ajustes por mínimos cuadrados. En todos los experimentos posteriores se mantuvieron constantes todos los parámetros espectroscópicos (λ_{exc} , λ_{em} , tamaño de rendija, etc.)

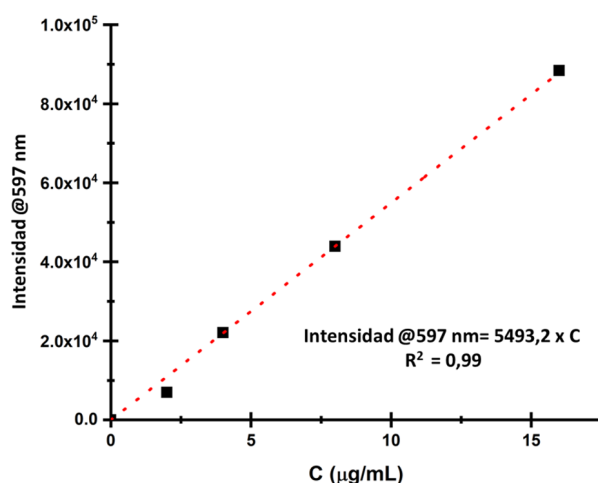


Figura 4.4: Representación gráfica de la recta obtenida por fluorimetría. Se observa que en el rango de concentraciones estudiado se cumple la linealidad con unos valores del cuadrado del coeficiente de regresión lineal de $R^2 = 0,99$.

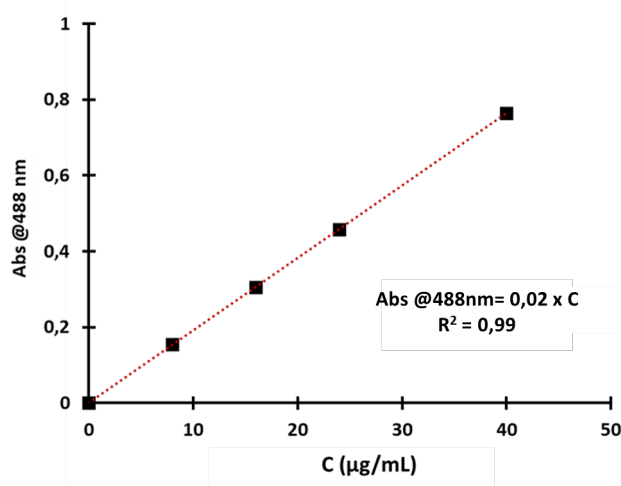


Figura 4.5: Representación gráfica de la recta obtenida por absorbancia. Se observa que en el rango de concentraciones estudiado se cumple la linealidad con unos valores del cuadrado del coeficiente de regresión lineal de $R^2 = 0,99$.

Ambas técnicas mostraron unos datos similares e igual de fiables de cuantificación de doxorrubicina liberada al medio (PBS) en el estudio de liberación, aunque la medición de la fluorescencia presenta mayor sensibilidad, por lo que el empleo de cualquiera de las técnicas ayudaría a conocer la concentración de la doxorrubicina.

Liberación de la doxorrubicina en PBS

Como ya se ha comentado en otras secciones de este trabajo, hay numerosos nanosistemas capaces de transportar y liberar un fármaco encapsulado tras la activación por diferentes estímulos. Se pueden adoptar dos enfoques para diseñar nanosistemas liberadores de fármacos que respondan a estímulos. En un enfoque, se pueden aprovechar los estímulos endógenos para mejorar la liberación del fármaco. Estos incluyen el pH o la degradación

enzimática [366]. Este efecto requiere la selección de materiales apropiados para el diseño de los nanotransportadores, que deben responder a un estímulo endógeno específico liberando todo el fármaco encapsulado simultáneamente (la llamada liberación rápida o “*burst release*”). En el segundo enfoque, los estímulos físicos se aplican externamente al tejido diana después de la administración de nanotransportadores específicos cargados con fármaco. Estos estímulos exógenos incluyen temperatura, luz, campos magnéticos, campos eléctricos, ultrasonidos y microondas [367]. La aplicación de estos estímulos exógenos son responsables de la alteración de la estructura de los nanotransportadores diseñados específicamente, lo que conduce a la liberación del fármaco en los tejidos diana [368, 369]. En algunos nanosistemas como los liposomas [370], el fármaco se libera en dos pasos. El primero es al entrar en contacto con la sangre, liberando el fármaco adsorbido en su superficie produciendo un efecto de liberación explosiva que desencadena un pico de actividad del fármaco a nivel local o sistémico, similar al efecto observado cuando se administra el fármaco libre. Durante la segunda fase, se libera la carga del fármaco encapsulado en el interior.

Para testar la liberación de estas SLPs *in vitro*, se realizaron dos experimentos. Por un lado, se cuantificó el patrón de liberación del fármaco de las partículas para conocer el perfil de liberación de la doxorrubicina en condiciones fisiológicas (pH=7,4; 37°C). Para ello, se tomaron 0,3 mL de una solución de partículas cargadas con 20 mg/mL de doxorrubicina en PBS y se incubó la muestra en rotación continua a 37 °C dentro de una membrana de diálisis. La Figura 4.6 muestra cómo las SLPs presentan una fase inicial de liberación rápida, donde aproximadamente un tercio del fármaco “encapsulado” se libera en el medio durante las primeras 5 horas. Después de esta fase inicial, se observó un patrón de liberación prolongada y sostenida del fármaco que duró más de 40 días, por lo que el perfil de la doxorrubicina presenta una liberación bifásica. La hipótesis de trabajo es que esta primera fase de liberación rápida o “*burst release*” se relaciona con la cantidad de doxorrubicina adherida a la superficie de la partícula, hipótesis que corroboran los resultados obtenidos de carga superficial mediante el potencial zeta de estas mismas partículas (Fig.4.2), y la segunda fase se deba a la cantidad de fármaco que se encuentra dentro de las partículas y que es liberado de forma sostenida [371].

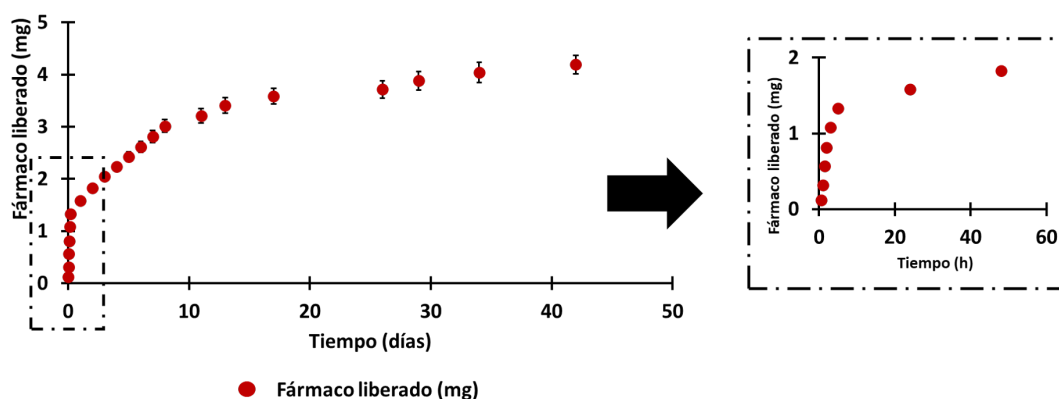


Figura 4.6: Gráfica de liberación de la doxorrubicina frente al tiempo en medio fisiológico (PBS). En rojo se muestra la liberación de la doxorrubicina expresada como el acumulado del fármaco liberado frente al tiempo.

Ajuste al modelo cinético de Korsmeyer-Peppas

Una vez obtenidos los datos de la liberación de la doxorrubicina, se ajustaron a diferentes modelos cinéticos. Estos modelos permiten entender cuál es el mecanismo que presenta el nanosistema al liberar el fármaco. Existen diversos modelos empleados en la liberación de fármacos, pero en este caso el modelo matemático que mejor se ajustó con un número menor de parámetros fue el propuesto por *Korsmeyer-Peppas* [344] (Figura 4.7) marcado con una línea en color verde. El ajuste con este modelo indica que el valor del exponente de difusión (Fig. 3.4) es $n \approx 0,28$. Este valor, de acuerdo con este modelo, corroboró que el mecanismo de liberación del fármaco de las SLPs fue por difusión siguiendo el modelo de Fick, ya que el valor del exponente de difusión (n) es $<0,5$ (Sección 3.3.6 de Materiales y Métodos). Estos resultados coinciden con otros sistemas basados en partículas de matriz lipídica [343, 372].

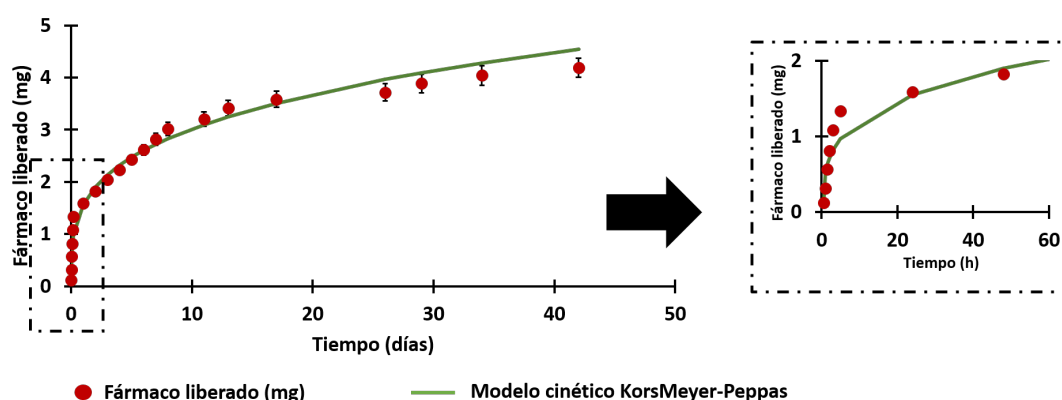


Figura 4.7: Ajuste al modelo cinético de Korsmeyer-Peppas de la liberación de la doxorrubicina frente al tiempo en medio fisiológico (PBS). En rojo se muestra la liberación de la doxorrubicina expresada como el acumulado del fármaco liberado frente al tiempo y en verde el ajuste al modelo cinético de Korsmeyer-Peppas.

4.1.4. Liberación de doxorrubicina en cultivos celulares de melanoma murino.

Para complementar el estudio anterior de liberación *in vitro* de las partículas lipídicas cargadas con doxorrubicina, se realizó un ensayo en cultivos celulares empleando células de melanoma murino (B16-F10). Para ello se añadieron a dichos cultivos celulares $2 \mu\text{g/mL}$ de SLPs cargadas con doxorrubicina, dispersadas previamente en baño de ultrasonidos para evitar agregados, y a continuación se recogieron muestras de estas células a diferentes tiempos para ser analizadas mediante microscopía confocal de fluorescencia. Basándonos en la capacidad de las partículas cargadas con doxorrubicina de emitir fluorescencia ($\lambda_{\text{em}} = 597 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$), las imágenes de la Figura 4.8 revelaron la liberación de la doxorrubicina de las partículas mediante la aparición progresiva de la fluorescencia propia de la doxorrubicina [75]. Esta fluorescencia se acumula en el núcleo celular durante las primeras 48 horas. Este segundo estudio complementó el primero (Fig.4.6) al apreciar esa liberación progresiva del fármaco a tiempos cortos de incubación en cultivos celulares tras 2, 16 y 48 horas.

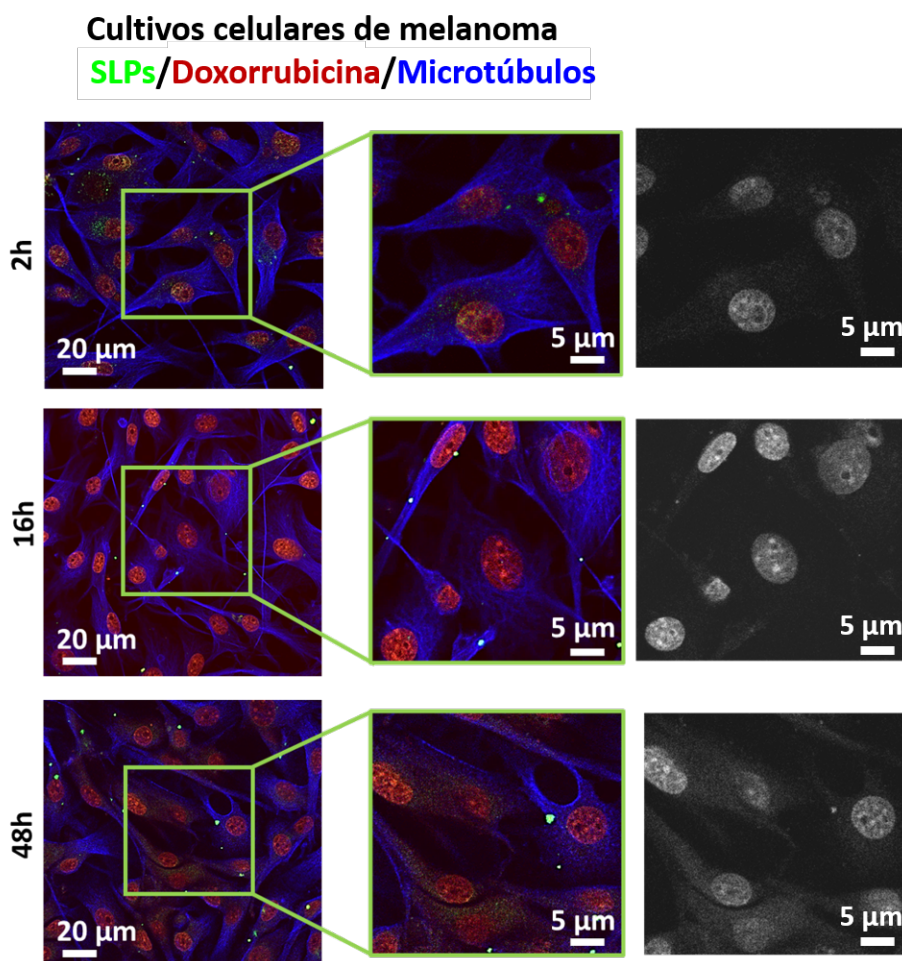


Figura 4.8: Liberación de doxorubicina de las SLPs cargadas con el fármaco (SLPs-DOX) en cultivos celulares *in vitro*. Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia de células de melanoma murino tratadas con SLP-DOX durante 2, 16 y 48 horas. Los SLPs aparecen en el canal verde y los microtúbulos se muestran en el canal azul. La fluorescencia roja del núcleo es indicativa de la presencia de doxorubicina liberada.

4.1.5. Localización intracelular de las partículas sólidas lipídicas en células de melanoma

También se quiso conocer la localización intracelular de las SLPs cuando eran administradas a cultivos celulares de melanoma murino (B16-F10) mediante microscopía electrónica de transmisión. Para ello, se incubaron células de melanoma murino en presencia de 4 $\mu\text{g/mL}$ de SLPs y se fijaron a diferentes tiempos (Fig. 4.9). Tras el tratamiento explicado previamente en la Sección 3.4.6 de Materiales y Métodos se obtuvieron las muestras para ser analizadas.

4.1.6. Ensayo de la biodistribución de las partículas sólidas lipídicas

Se ha descrito en diversos estudios que las SLPs tienen varias ventajas en el tratamiento de patologías pulmonares, tales como: un tamaño adecuado, posible retención en pulmones, baja toxicidad y liberación prolongada del fármaco [373]. Una vez que se

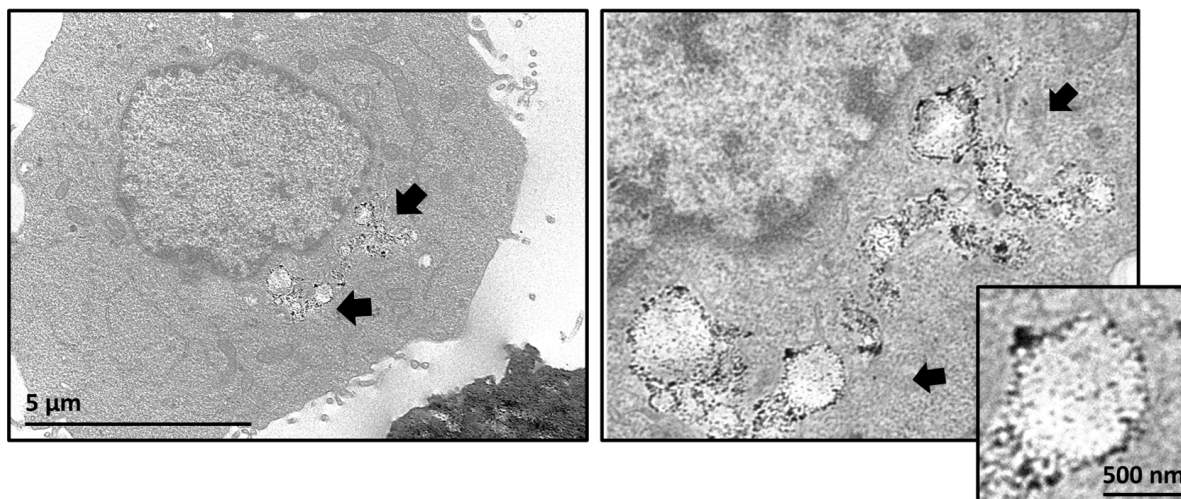


Figura 4.9: Imagen obtenida por microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las partículas sólidas lipídicas tras 48 horas de incubación con células de melanoma murino B16-F10. Puede apreciarse como las SLPs se encuentran en el citoplasma de la célula. Esta observación pudo llevarse a cabo gracias a la presencia de nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AO}$ en el interior de la matriz lipídica, y en consecuencia, a la diferencia de densidad electrónica de estas nanopartículas respecto al entorno celular.

realizaron estudios *in vitro* de las SLPs cargadas con doxorrubicina, el siguiente ensayo fue *in vivo* para conocer la distribución de las SLPs cuando eran administradas por vía i.v. Para ello, se administraron partículas de SLPs control (sin carga de fármaco) fluorescentes en ratones (C57BL/6) y se analizó la presencia de fluorescencia (DiO) mediante microscopía confocal de fluorescencia en criosecciones de 15 μm de tejido pulmonar de ratones, que se fijaron en paraformaldehído (4 %) y donde los núcleos se tiñeron con Hoechst. La Figura 4.10 muestra imágenes de microscopía confocal de los pulmones de ratones tratados con SLPs.

Las partículas se identificaron como pequeñas manchas verdes en las proximidades de los núcleos de las células. Las partículas fueron observadas en el tejido pulmonar a las 3 y 8 horas después de la inyección i.v. Para confirmar esta distribución pulmonar después de un largo período de tiempo (20 días post-inyección), se realizó una prueba de biodistribución adicional mediante la cuantificación del contenido de hierro por ICP-OES. Esta técnica se realizó en colaboración con el grupo del Dr. Manuel Bañobre en el Instituto Ibérico Internacional de Nanotecnología. El análisis de las muestras lo realizó la Dra. Lorena García-Hevia. Este estudio se pudo realizar gracias a la encapsulación de nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AO}$ en la matriz de cera (Fig. 4.3). Para este propósito, se sacrificaron 4 ratones por grupo de tratamiento tras 20 días de la administración de las SLPs, se estudiaron diferentes órganos y se midió la cantidad de hierro presente mediante el uso de rectas de calibrado. Este análisis reveló una amplia distribución de las SLPs en los órganos analizados, como se documenta en otros estudios [90], pero también una acumulación pulmonar de las partículas 20 días después de la inyección (Fig. 4.11). Juntos, todos estos resultados confirmaron que las SLPs se dirigen, en parte, a los tejidos pulmonares.

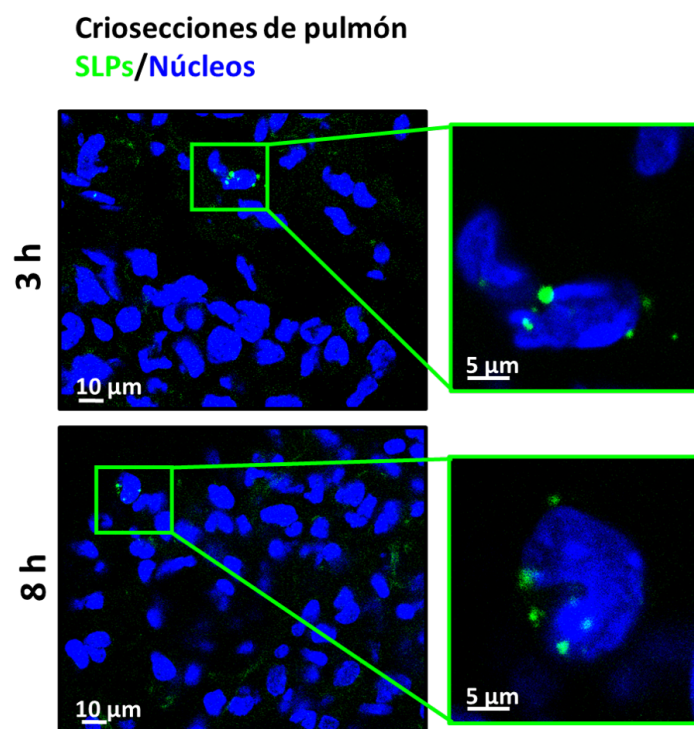


Figura 4.10: Biodistribución de las SLPs al administrarlas por vía intravenosa. Las SLPs (verde) se observan en tejido pulmonar a las 3 y 8 horas tras su administración.

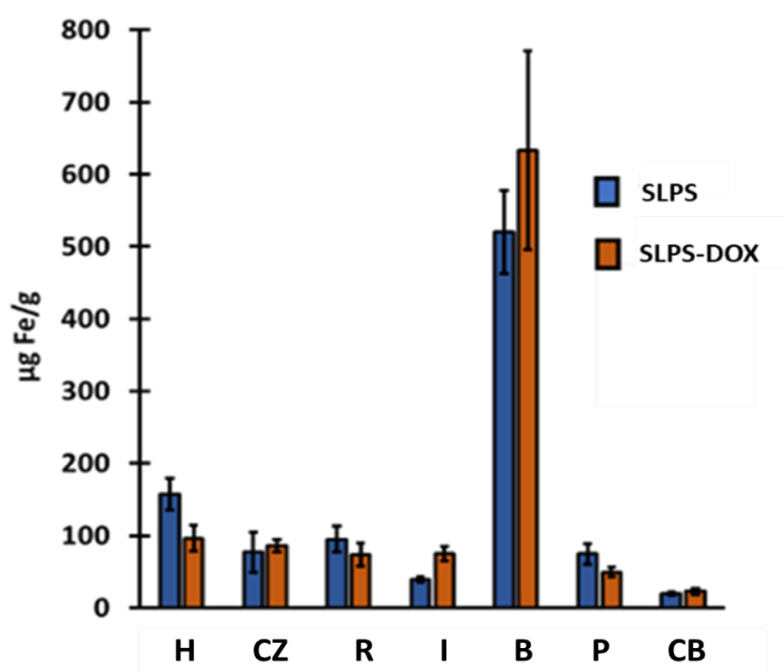


Figura 4.11: Biodistribución de las SLPs al administrarlas por vía intravenosa. Tras 20 días, las SLPs se distribuyen por todo el organismo, reteniéndose también en pulmón. Los diferentes órganos se corresponden con las letras H (hígado), CZ (corazón), R (riñón), I (intestino), B (bazo), P (pulmón) y CB (cerebro). Los valores están normalizados respecto a ratones control.

Tras estudiar la biodistribución de las SLPs en ratones, se pudo observar como una gran parte de las SLPs inyectadas se encontraban 20 días después de la inyección intravenosa mayoritariamente en el bazo. Esta acumulación de las SLPs en el bazo ya ha sido observada en estudios previos [374,375] y se debe al reconocimiento y posterior fagocitosis de estas SLPs por parte de los macrófagos, al presentar una superficie hidrofóbica que genera esta respuesta inmediata de los mismos y, en consecuencia, la eliminación de estas partículas del torrente sanguíneo [376,377].

Las SLPs sintetizadas en este trabajo son estables, inertes y seguras, y lo más importante, proporcionan una retención del fármaco a largo plazo [378] sumado a la capacidad de encapsular fármacos con solubilidad limitada en medios fisiológicos. Los resultados presentados en esta Tesis muestran que la eficiencia de encapsulación del fármaco fue del E.E. $\approx 86\%$, con una liberación sostenida durante más de 40 días a una velocidad constante (Fig. 4.6). Esta es una ventaja importante de estos sistemas en comparación con otros sistemas de liberación como los liposomas convencionales que, en general, no pueden alcanzar valores de eficiencia de encapsulación tan altos (los procesos de alta presión desarrollados recientemente [379] pueden lograr una encapsulación de fármacos por encima del 90 %, pero aún no se emplean en la práctica común). Además, como se muestra en la Figura 4.11, estas SLPs presentan una amplia distribución, reteniéndose en diferentes órganos (en mayor o menor medida), lo que permite la liberación sostenida del fármaco directamente en estos tejidos.

4.1.7. Puesta a punto y optimización del modelo tumoral

El siguiente objetivo era determinar si la doxorrubicina encapsulada dentro de las SLPs, era capaz de mejorar su efecto antineoplásico en ensayos *in vivo*. Para ello, fue necesario optimizar y poner a punto un modelo tumoral en ratones. El modelo que se eligió fue el modelo tumoral de melanoma metastásico de células murinas (B16-F10). Este modelo murino ha sido utilizado con anterioridad en diversos trabajos [352–354], ya que presenta numerosas ventajas respecto a otros modelos tumorales. Es un modelo sencillo de reproducir, los tumores se generan con rapidez y, sobre todo, estas células de melanoma murino tienen la característica de producir melanina durante su crecimiento, por lo que los tumores se pueden apreciar a simple vista, mostrando los beneficios de este modelo frente a otros modelos tumorales. Tras la elección del modelo, se optimizó y se consiguió generar metástasis tumoral en pulmón a los 20 días, tras la administración de 100.000 células/ratón administrados por vía intravenosa, más concretamente por el seno retro-orbital, tal y como se explica en la Sección de Materiales y Métodos (Fig. 3.13.)

4.1.8. Inhibición del crecimiento metastásico tumoral mediante el tratamiento con partículas sólidas lipídicas

Una vez puesto a punto el modelo tumoral, se quiso investigar la capacidad de las SLPs cargadas con doxorubicina para inhibir la metástasis de melanoma en los pulmones de ratón. Para lograr este objetivo, se diseñó un plan experimental como se indica en la Figura 4.12.

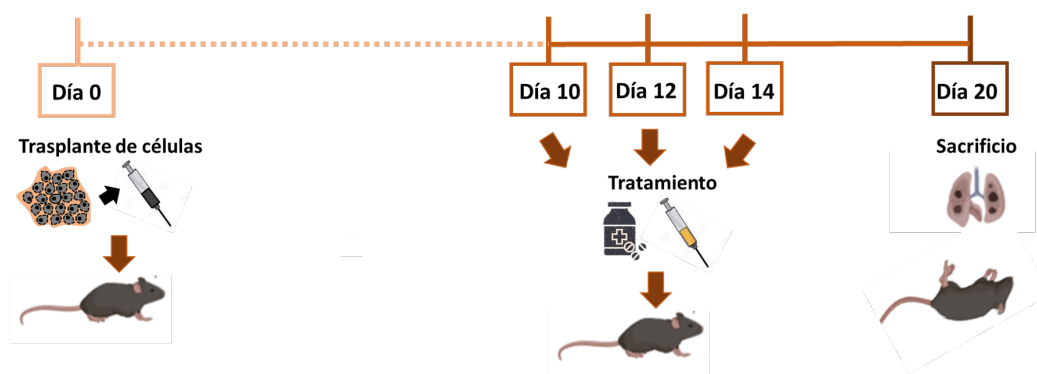


Figura 4.12: Esquema que representa el diseño del estudio de inhibición tumoral.

Para el estudio, los animales portadores de metástasis fueron tratados por vía intravenosa con 3 dosis de 2,5 mg/kg de doxorubicina en solución o la cantidad equivalente de fármaco encapsulado en SLPs, después de 10, 12 y 14 días tras el trasplante de células. Los animales se sacrificaron el día 20 después del trasplante celular. Los pulmones se diseccionaron en fresco, se fotografiaron y conservaron mediante fijación en formalina. Después de 20 días de inyección intravenosa de las células, se observaron claramente colonias de células metastásicas en la superficie de los pulmones de todos los ratones inyectados, como se muestra a modo de ejemplo en la Figura 4.13.

La Figura 4.13 muestra ejemplos de los pulmones con los diferentes tratamientos. Se puede observar que los pulmones tratados tienen menos trazas metastásicas y más pequeñas que los controles negativos. De hecho, los pulmones tratados con SLPs mostraron incluso menos metástasis. Las imágenes histológicas teñidas con tinción de hematoxilina y eosina corroboran los resultados obtenidos mediante las imágenes de los pulmones en fresco, observándose esas trazas metastásicas características en los tejidos. Estas colonias metastásicas superficiales son representativas de las que se observan en “volumen” a la vista de los cortes histológicos. Tras sacrificar a los ratones de los diferentes grupos experimentales y recoger los pulmones, se realizó la cuantificación de las metástasis de todos los pulmones. Esta cuantificación se llevó a cabo mediante el programa ImageJ, analizando el área afectada del pulmón por metástasis respecto al área total, tal y como se explicó en la Sección de Materiales y Métodos (Fig. 3.15), analizando el área afectada en comparación con el área total del pulmón.

Los resultados de la cuantificación de metástasis se representan como el porcentaje del área total afectada por las metástasis pulmonares frente al área total del pulmón obtenidas tras diferentes tratamientos (ratones tratados con SLPs control [$n = 43$], con doxorubicina

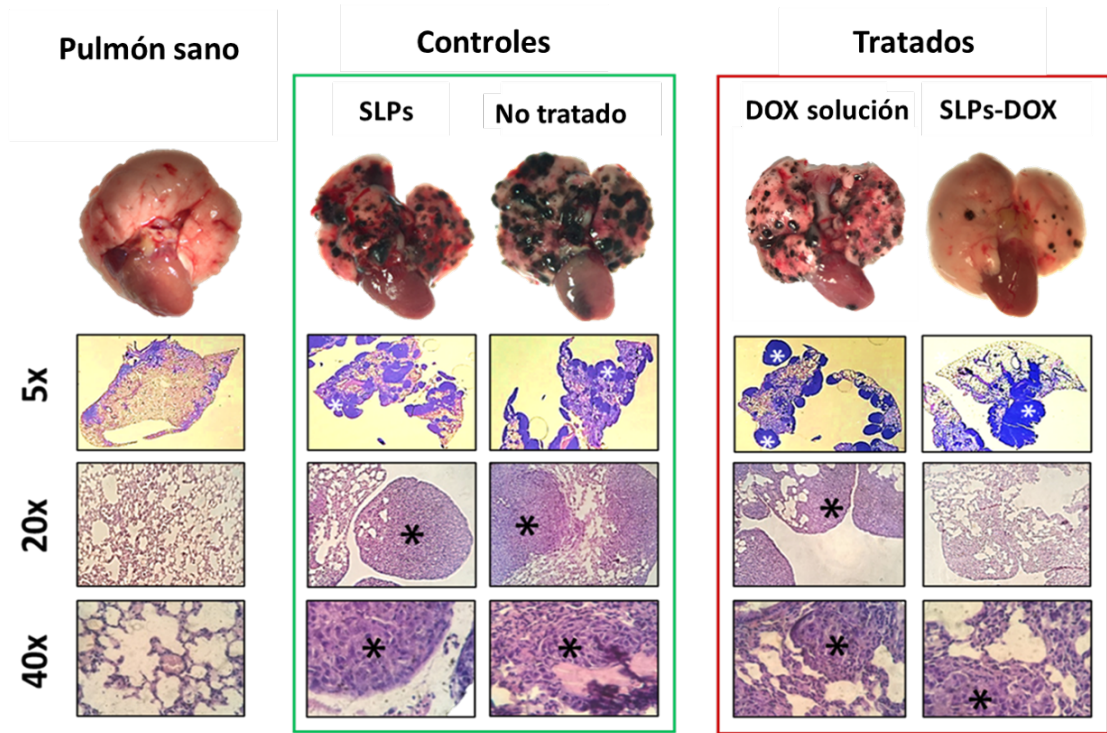


Figura 4.13: Representación en fresco de cada grupo del experimento. Se muestran fotografías de los pulmones en fresco y (abajo) secciones de los mismos, teñidos con hematoxilina y eosina. Las masas tumorales se encuentran marcados con un asterisco (*).

en solución [$n=49$] y otro grupo de ratones tratados con SLPs-DOX [$n=37$], frente a un grupo de ratones con metástasis pulmonar que no fueron tratados [$n = 46$] (Fig. 4.14). Los ratones no tratados son aquellos a los que sólo se les administró el trasplante celular y se ha considerado que presentan el 100 % del área pulmonar afectada. La cuantificación se llevó a cabo por ambas caras de cada pulmón estudiado (Sección 3.6.6 de Materiales y Métodos), tomando cada cara del pulmón como una muestra, por lo que la muestra total (n) cuantificada para la estadística de cada grupo experimental es el doble del número de ratones empleado en cada caso. La Figura 4.14 muestra cómo los animales tratados con SLPs-DOX tienen un 60 % de reducción de área afectada por metástasis en comparación con los ratones tratados con doxorrubicina en solución. Esta diferencia, junto con la diferencia entre los ratones tratados con SLPs-DOX y los ratones no tratados, es estadísticamente significativa para una $t_{99,9}$.

Como ya se ha comentado previamente en este trabajo, cuando un tumor crece puede producir que algunas células cancerosas se desprendan y se muevan a lugares distantes del cuerpo formando nuevos tumores lejos del tumor primario (Fig. 1.12). Este es el proceso denominado metástasis. Con el objetivo de conocer si la doxorrubicina encapsulada en las SLPs era capaz, no sólo de inhibir el crecimiento metastásico en pulmones sino también de evitar la formación de estas metástasis, se diseñó un segundo estudio. El objetivo era saber si con este tratamiento se conseguiría acabar con las células tumorales antes de que lleguen al órgano (en este caso el pulmón) y evitar así su asentamiento y que desarrollen la metástasis.

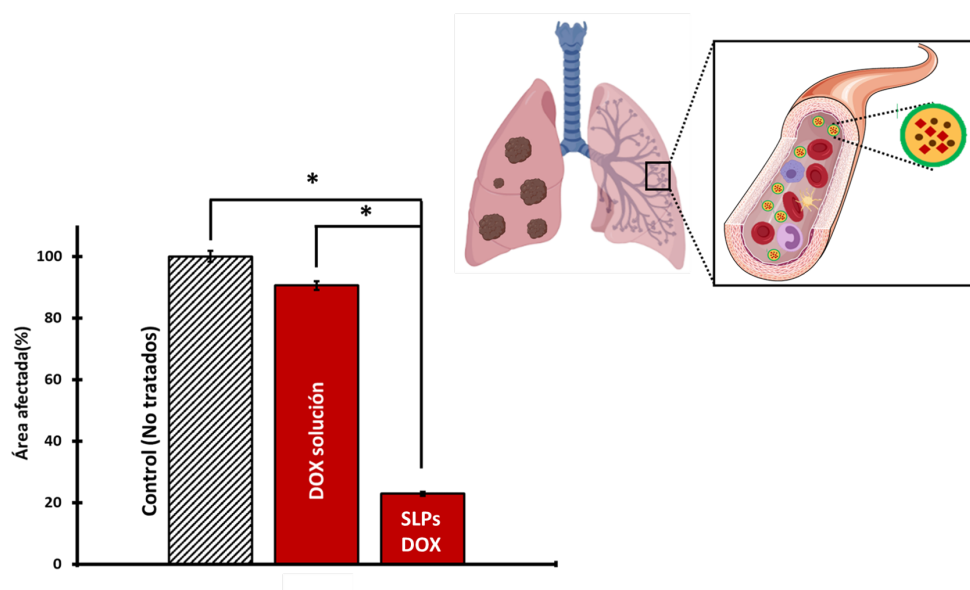


Figura 4.14: Cuantificación del área afectada por metástasis pulmonar en los diferentes grupos experimentales tras 20 días post-trasplante y tres dosis de tratamiento. Se puede observar una reducción de la metástasis cuando los pulmones se tratan con SLPs-DOX en comparación con los pulmones tratados con el fármaco libre ($t = 5,94$; $n = 172$; * $t_{99,9}$). Estas diferencias también son significativas entre los pulmones tratados con SLPs-DOX con respecto a los pulmones no tratados ($t = 5,83$; $n = 166$; * $t_{99,9}$).

4.1.9. Supresión de la formación de metástasis pulmonar mediante el tratamiento con partículas sólidas lipídicas

Para lograr este objetivo se usó el mismo modelo de metástasis tumoral que se ha empleado en los estudios anteriores, pero el diseño en este caso es diferente, tal y como se muestra en la Figura 4.15.

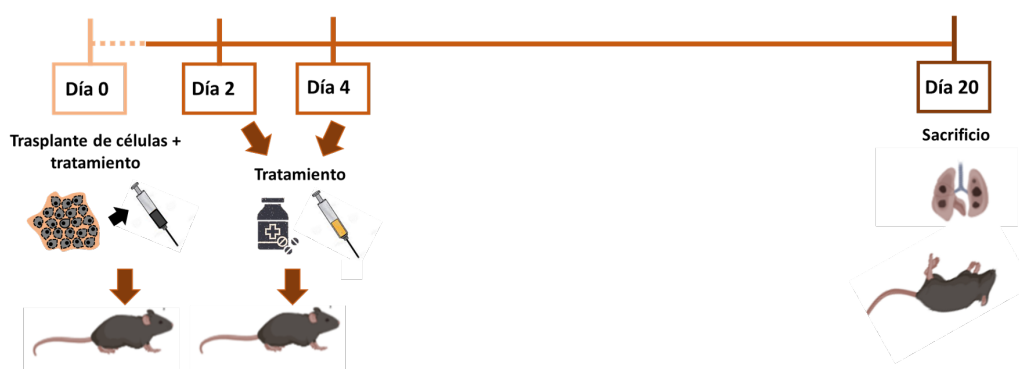


Figura 4.15: Esquema del estudio in vivo de la supresión en la formación de metástasis pulmonar.

Para el estudio, los animales fueron tratados por vía intravenosa con el mismo número de dosis que en el experimentos anterior (3 dosis de 2,5 mg/kg de doxorrubicina en solución o la cantidad equivalente de fármaco encapsulado en SLPs-DOX), pero en este caso la primera dosis de tratamiento se administró el primer día junto al trasplante de células tumorales. Las otras dos dosis restantes se administraron a día 2 y día 4 (Fig. 4.15).

Los animales se sacrificaron también el día 20 después del trasplante celular inicial. Los resultados de la cuantificación de metástasis se representan como el porcentaje del área total afectada por las metástasis pulmonares frente al área total del pulmón, tal y como se ha explicado previamente en la Sección 4.1.8 de Resultados. En este caso los grupos experimentales fueron los mismos que en la Sección 4.1.8 de Resultados (ratones tratados con SLPs control [$n = 10$], con doxorubicina en solución [$n = 8$] y otro grupo de ratones tratados con SLPs-DOX [$n = 7$], frente a un grupo de ratones con metástasis pulmonar que no fueron tratados [$n = 7$]) (Fig. 4.16). Los ratones no tratados son aquellos a los que sólo se les administró el trasplante celular y se ha considerado que presentan el 100 % del área pulmonar afectada. La cuantificación se llevó a cabo por ambas caras de cada pulmón estudiado (Sección 3.6.6 de Materiales y Métodos), tomando cada cara del pulmón como una muestra, por lo que la muestra total n cuantificada para la estadística de cada grupo experimental es el doble del número de ratones empleado en cada caso.

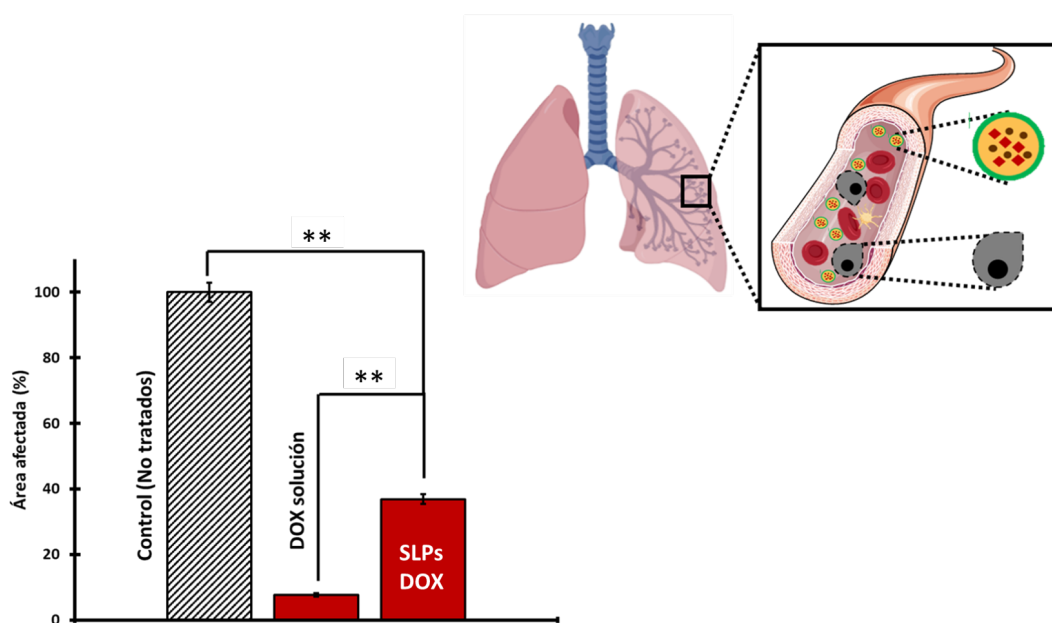


Figura 4.16: Cuantificación del área afectada por metástasis pulmonar en los diferentes grupos experimentales tras 20 días post-trasplante y tres dosis de tratamiento. Se puede observar una reducción de la metástasis cuando los pulmones se tratan con la doxorubicina en solución en comparación con los pulmones tratados con las SLPs-DOX ($t = 3, 02$; $n = 30$; ** $t_{99,5}$). Estas diferencias también son significativas entre los pulmones tratados con SLPs-DOX con respecto a los pulmones no tratados ($t = 3$; $n = 28$; ** $t_{99,5}$).

La cuantificación de la metástasis se realizó siguiendo la misma metodología que se ha explicado con el estudio anterior según el área afectada en los pulmones. En este estudio se observó cómo no hubo mejora del tratamiento cuando el fármaco iba encapsulado en las SLPs. El fármaco en solución presentaba un 20 % más de efectividad que cuando estaba encapsulado tras 20 días de experimento (Fig. 4.16). Esta diferencia, junto con la diferencia entre los ratones tratados con SLPs-DOX y los ratones no tratados, es estadísticamente significativa.

4.1.10. Estudio de toxicidad de las partículas sólidas lipídicas

De ambos experimentos se hizo un estudio sobre la posible toxicidad de los tratamientos en los ratones cuando se les produjo la metástasis durante el tiempo del experimento (20 días). Tras este período se observó que las SLPs no presentaban más toxicidad que el fármaco en solución en los ratones enfermos a los que se le produjo la metástasis, tanto en el estudio de inhibición tumoral como en el estudio de la supresión en la formación de metástasis (Fig. 4.17).

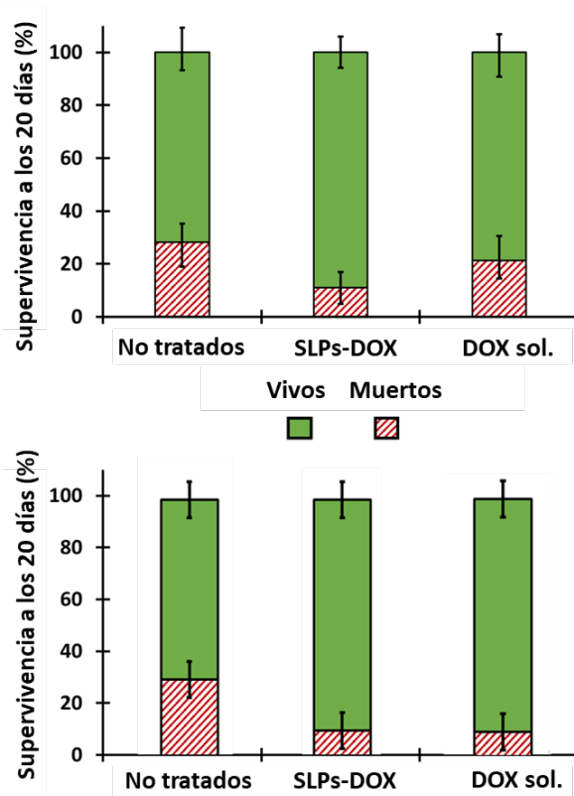


Figura 4.17: Representación gráfica de la toxicidad del tratamiento tras 20 días de estudio tras el trasplante con células de melanoma murino. Los ratones enfermos que sobrevivieron tras el experimento se muestran en color verde y los que murieron durante el experimento en color rojo. El experimento de arriba corresponde a la inhibición tumoral y el de abajo al estudio de la supresión tumoral.

4.1.11. Estudio de disminución del peso de los ratones

Otro de los estudios que se llevó a cabo en paralelo fue el control del peso de los ratones tras administrarles el trasplante de células de melanoma murino durante el tratamiento en los 20 días de estudio. Como se puede observar en la Figura 4.18 no hubo una disminución estadísticamente significativa del peso de los ratones entre los grupos experimentales, por lo que se puede concluir que las SLPs no presentan más toxicidad que

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

el fármaco en solución en los ratones enfermos a los que se le administró el tratamiento en ambos estudios.

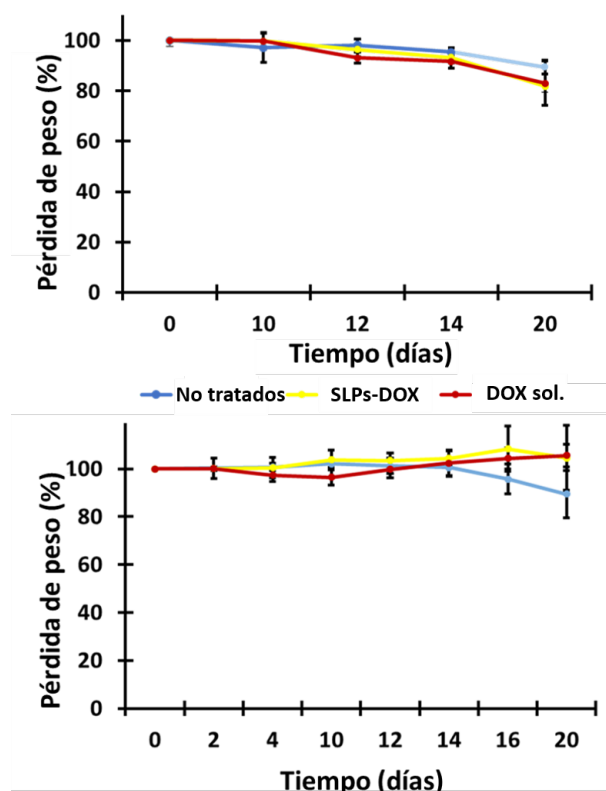


Figura 4.18: Representación gráfica de la pérdida de peso de los ratones a los que se le generó la metástasis con los diferentes grupos de tratamiento durante los 20 días de estudio. El experimento de arriba corresponde a la inhibición tumoral y el de abajo al estudio de la supresión tumoral.

En este trabajo se ha demostrado que la encapsulación del fármaco en las SLPs mejora el efecto antimetastásico del fármaco libre (Fig. 4.14), disminuyendo la toxicidad en los ratones estudiados (Fig. 4.17 y 4.18). Como se mencionó anteriormente, la liberación sostenida del fármaco estable y controlada a largo plazo proporciona resultados terapéuticos superiores a las dosis individuales suministradas periódicamente [380]. La administración intravenosa de fármacos convencionales suele dar lugar a concentraciones iniciales elevadas seguidas de una rápida disminución de la concentración por debajo de los límites terapéuticos como resultado de la metabolización o eliminación del fármaco [381]. Por lo tanto, de acuerdo con los resultados, nuestro sistema plantea la hipótesis de que la liberación del fármaco se produce en dos pasos bien diferenciados. El inicial, atribuido a las primeras 5 horas de liberación observadas *in vitro*, ocurre mientras el nanosistema circula en el torrente sanguíneo. Esto puede permitir la eliminación de la mayoría de las células cancerosas circulantes. El segundo, un paso de liberación sostenida, tiene lugar cuando el nanotransportador llega al tejido diana. Esto seguramente inhibe el crecimiento de las células metastásicas. Este patrón de liberación del fármaco reduciría significativamente las dosis iniciales del fármaco y disminuiría los efectos adversos de la quimioterapia (Fig. 4.19). Dado que en la preparación de estas partículas sólidas lipídicas el fármaco se integra

dentro de la matriz además de adsorberse en la superficie de las partículas, como apunta el cambio significativo en el potencial ζ de -10 a +23 mV, nuestro sistema es capaz de proporcionar este efecto de liberación de fármaco en dos pasos.

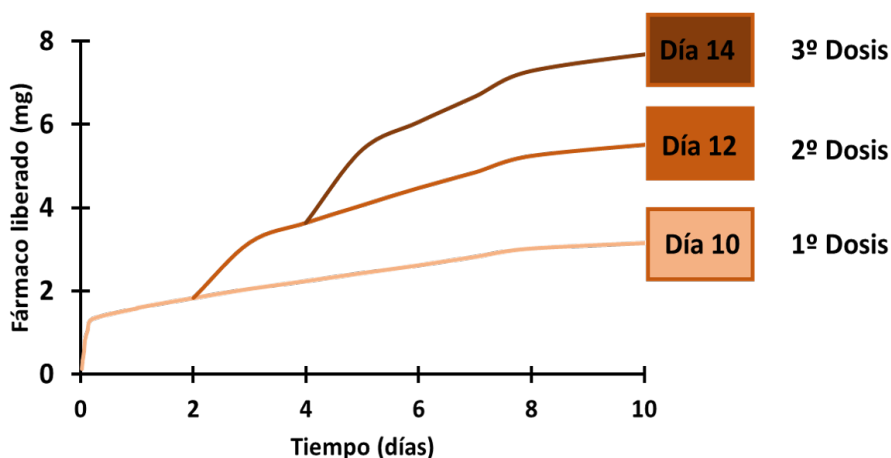


Figura 4.19: Simulación de los niveles de doxorrubicina tras la administración de diferentes dosis de las SLPs en modelos *in vivo*.

Es bien sabido que los modelos de ratón son una herramienta importante para comprender el complejo mecanismo involucrado en el proceso de formación de la metástasis y para identificar nuevos objetivos o mejorar los enfoques terapéuticos [382]. Estudios anteriores ya han establecido la eficacia antitumoral de este tipo de formulación en modelos de melanoma [383]. Este trabajo se ha centrado en el efecto de las SLPs-DOX sobre la inhibición de la metástasis. Para evaluar este efecto antimetastásico *in vivo*, se generó un modelo de metástasis pulmonar de melanoma en ratones adultos de la cepa C57BL/6 según la Figura 4.13. Este modelo presenta la ventaja de producir colonias de tumores metastásicos de color negro, visibles a simple vista en el tejido pulmonar. En estudios previos, se ha demostrado que las SLPs son eficaces contra la metástasis utilizando fármacos quimioterápicos como paclitaxel [384], etopósido [239] y derivados de éster de ácido gálico [255], entre otros. Nuestros resultados indican que las SLPs-DOX exhiben un mayor efecto antimetastásico que la doxorrubicina en solución y sin toxicidad detectable durante el tiempo de duración del experimento. Este efecto antimetastásico puede deberse a la liberación estable del fármaco a lo largo del tiempo de estas SLPs. Esta velocidad de liberación del fármaco es particularmente interesante porque permitiría mantener el nivel del fármaco dentro de la ventana terapéutica, que es crucial para la inhibición del tumor primario. Esta velocidad de liberación del fármaco, en combinación con la acumulación local en los pulmones, ejerce un efecto antimetastásico mejorado en comparación con la del fármaco convencional; específicamente, SLPs-DOX muestran un 60 % más de efecto antimetastásico que el fármaco en solución (Fig. 4.14).

En resumen, en esta Tesis se ha mostrado la capacidad de encapsular doxorrubicina en SLPs y se ha evaluado el potencial de estas partículas para liberar el fármaco en tumores metastásicos en ratones. Se ha demostrado cómo la fracción lipídica de las partículas puede mejorar significativamente la carga de fármaco y, por tanto, generar formulaciones con una carga de fármaco mejorada y una estabilidad superior. Además, se muestra cómo estas

SLPs permiten una alta retención del fármaco bien en la matriz o en su superficie, lo que desencadena una liberación sostenida del fármaco al llegar al tejido diana [273]. Este estudio también ha mostrado una reducción de los posibles efectos adversos de la doxorubicina encapsulada (Fig. 4.17, 4.18), como es el caso de las formulaciones liposomales aprobadas por la FDA. Sin embargo, lo que es más interesante, es que se ha demostrado cómo la liberación sostenida del fármaco al llegar la partícula al tejido diana da como resultado un efecto antimetastásico mejorado. Este efecto de liberación sostenida *in situ* permite una eficacia local mejorada y una toxicidad reducida en comparación con las formulaciones liposomales ya disponibles para uso clínico, donde la liberación es más rápida y con una mayor concentración de fármaco, provocando posibles efectos adversos como el síndrome de eritrodisestesia palmoplantar. Por último, indicar que las SLPs también se pueden preparar con nanopartículas de hierro encapsuladas en su interior (Fig. 3.1), que en trabajos futuros podrían servir, no sólo para desencadenar la liberación de fármacos a demanda mediante estímulos externos en los tejidos y órganos de interés, sino también para su uso en técnicas de imagen o terapia de hipertermia, mejorando el efecto de la doxorubicina en una zona concreta [367].

4.2. Diseño de sistemas de encapsulación frente a infecciones intracelulares

La terapia antimicrobiana es otra área en la que se está investigando sobre el diseño y empleo de nanosistemas de transporte y liberación de fármacos. Esta terapia presenta similitudes a las terapias antineoplásicas, previamente explicadas. El uso de agentes antimicrobianos está frecuentemente limitado por la aparición de efectos adversos o por una administración ineficaz y deficiente. Existen fármacos de amplio espectro de acción, pero su uso en clínica se encuentra muy limitado por presentar perfiles farmacocinéticos inadecuados [39]. Además, la aparición cada vez más frecuente de resistencias de muchos organismos a terapias que previamente resultaban efectivas ha generado la necesidad de desarrollar nuevas alternativas, muchas de ellas centradas en el empleo de nanosistemas de transporte de fármacos. En este estudio se han empleado dos antibióticos de diferentes grupos, la enrofloxacin (perteneciente al grupo de las quinolonas) y el cloranfenicol (el fármaco más conocido de la familia de los fenicoles). Ambos presentan unas características comunes que los hacen inadecuados para su uso en clínica y no se encuentran dentro de los fármacos de primera línea, como son su baja hidrosolubilidad (aspecto que condiciona su biodisponibilidad en el organismo y el acceso a su diana farmacológica) [42, 385] y sus efectos adversos provocados por una falta de especificidad sobre el lugar de acción [316, 320]. Por esto, se han elegido estos dos fármacos como candidatos para ser encapsulados en nanosistemas de liberación de fármacos.

4.2.1. Síntesis de las partículas sólidas lipídicas cargadas con enrofloxacin

La síntesis de estas partículas fue realizada, gracias a una colaboración durante mi estancia predoctoral en el laboratorio del Dr. Manuel Bañobre en el Instituto Ibérico Internacional de Nanotecnología (INL) en Braga, Portugal. Las SLPs se sintetizaron

siguiendo el proceso de fusión-emulsión modificado descrito previamente en la Sección de Materiales y Métodos (Fig. 3.2). En secciones anteriores (Sección 4.1.1 de Resultados) también se ha explicado el porqué de la elección de este nanosistema, así como de sus componentes. En este caso se sintetizaron las SLPs empleando la misma matriz lipídica (cera de *Carnauba*), pero a diferencia de la anterior, se sintetizaron dos tipos de SLPs, con y sin nanopartículas de Fe_3O_4 @AO en su interior (como se explicó en la Sección 4.1.1 de Resultados) (Fig. 4.20 y (Fig. 4.21). El motivo de sintetizar los dos tipos de partículas se explicará más adelante. A la matriz hidrófoba de cera de *Carnauba* también se le añadió un colorante fluorescente (DiR) para fines de detección e imagen [386]. Este colorante presenta muchas similitudes con el explicado previamente (DiO), ya que ambos componentes presentan una afinidad muy alta por componentes altamente lipófilos debido a su naturaleza hidrófoba. La sustitución del DiO por el DiR se realizó para la detección y posterior estudio de las muestras mediante la técnica de microscopía confocal de fluorescencia, ya que en esta sección (como se explicará más adelante) se introducen nuevos elementos en las muestras con emisión de fluorescencia en otros canales. Así, con el empleo del DiR para las partículas sintetizadas (con emisión en canal de infrarrojo), se evitan posibles solapamientos con la emisión de fluorescencia de otros elementos y tinciones celulares. Este colorante, permite por tanto, la localización de partículas, a nivel celular y tisular, mediante el empleo de técnicas de fluorescencia.

Por último, las partículas se cargaron con un 20 % (p/p) del antibiótico elegido (enrofloxacin). Este fármaco perteneciente a la familia de las quinolonas presenta ventajas frente a otros antibióticos por ser de amplio espectro, es decir, muestra eficacia frente a bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas, pero a su vez, presenta un perfil farmacocinético inadecuado (alta distribución y falta de especificidad por células procariotas) provocando efectos adversos a dosis altas. Además, es poco soluble en agua debido a su naturaleza hidrófoba [327]. Por estos motivos se consideró que las propiedades farmacocinéticas de este fármaco podrían mejorarse sustancialmente y que presentaba características adecuadas para ser encapsulado y vehiculado en un nanosistema de base lipídica.

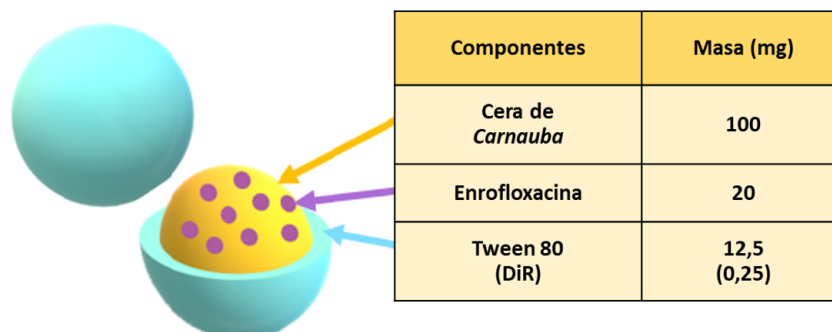


Figura 4.20: Esquema de las SLPs cargadas con enrofloxacin sintetizadas por el método de fusión-emulsión modificado con las cantidades de los componentes añadidos en la síntesis.

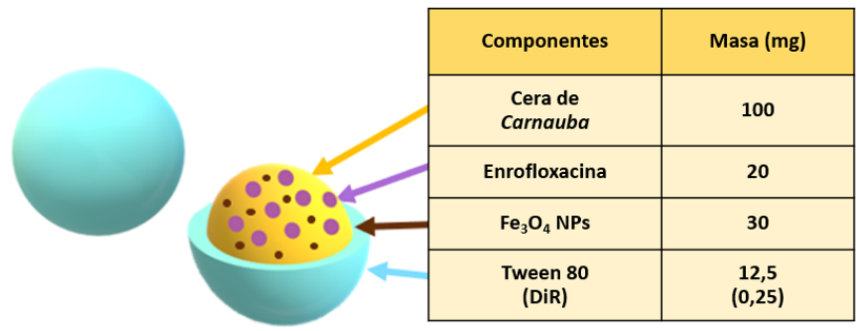


Figura 4.21: Esquema de las SLPs cargadas con enrofloxacin y con nanopartículas de Fe₃O₄@AO sintetizadas por el método de fusión-emulsión modificado con las cantidades de los componentes añadidos en la síntesis.

4.2.2. Caracterización de las partículas sólidas lipídicas

Potencial zeta y tamaño

La caracterización de las SLPs fue realizada en el laboratorio del Dr. Manuel Bañobre en el Instituto Ibérico Internacional de Nanotecnología (INL) en Braga, Portugal. Las SLPs presentaron un valor de potencial ζ de -46 mV y -58 mV para las SLPs control (sin carga de fármaco) y SLPs cargadas con enrofloxacin, respectivamente (Tabla 4.1). En cuanto al tamaño de las SLPs, se midieron empleando la técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS). Las partículas presentaron un diámetro hidrodinámico de aprox. 180 nm, en el caso de las partículas control, y de aprox. 275 nm para las partículas cargadas con el antibiótico (Tabla 4.1). Este aumento del tamaño de partícula cuando el antibiótico está encapsulado puede indicarnos que el fármaco, al presentar una naturaleza lipófila, favorece el aumento de tamaños en las SLPs. Los tamaños de ambas partículas se encuentran dentro del rango esperado según el método de síntesis empleado [86]. El índice de polidispersión fue de $\approx 0,4$ para ambos nanosistemas.

Tabla 4.1: Medidas de potencial zeta y de tamaño de las SLPs cargadas con enrofloxacin frente a las SLPs control.

Nanosistema	Potencial ζ (mV)	Tamaño (nm)
SLPs	- 46 \pm 16	179 \pm 69
SLPs-Enrofloxacin	- 59 \pm 14	276 \pm 74

En el caso de la síntesis de las mismas partículas, pero a las que se le incluyó nanopartículas de Fe₃O₄@AO para posteriores ensayos (Tabla 4.2), los datos no variaron significativamente ya que en cuanto al potencial zeta las medidas oscilaron entre -38 mV en el caso de las partículas control y de -59 mV, manteniéndose unos datos muy próximos a los mencionados previamente. En cuanto al diámetro hidrodinámico, las medidas siguen estando en el rango de 200-300 nm, aunque en este caso las partículas control mostraron valores superiores por lo que pensamos que la variación pueda deberse a la técnica

empleada [387]. El índice de polidispersión coincidió con los indicados previamente de $\approx 0,4$ para ambos nanosistemas.

Tabla 4.2: Medidas de potencial zeta y de tamaño de las SLPs cargadas con enrofloxacin y con nanopartículas de Fe_3O_4 @AO frente a las SLPs control.

Nanosistema	Potencial ζ (mV)	Tamaño (nm)
SLPs + NPs (Fe_3O_4)	-38 ± 1	286 ± 22
SLPs-Enrofloxacin + NPs (Fe_3O_4)	-59 ± 1	227 ± 27

Microscopía electrónica de transmisión (TEM) y de barrido (SEM)

El empleo de ambas técnicas en la caracterización de las SLPs sintetizadas se llevó a cabo durante mi estancia predoctoral en el laboratorio del Dr. Manuel Bañobre en el Instituto Ibérico Internacional de Nanotecnología (INL) en Braga, Portugal. Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión mostraron que la morfología de las SLPs sintetizadas presentaban una forma cuasi-esférica, tanto en las SLPs que no presentan nanopartículas de Fe_3O_4 @AO en su síntesis (Fig. 4.22), como en las que sí (Fig. 4.23), de la misma forma que se había observado en la síntesis de las SLPs con doxorubicina (Fig. 4.3). En el caso de las SLPs en las que se añadieron nanopartículas de Fe_3O_4 @AO en su interior, éstas se pueden observar claramente dentro de la matriz como esferas con distinto contraste por su diferente densidad electrónica. Este fenómeno ya se observó previamente en la Fig. 4.3. Las muestras de las SLPs también fueron estudiadas por microscopía electrónica de barrido donde se apreció esta morfología redondeada anteriormente comentada característica de estas partículas (Fig. 4.22).

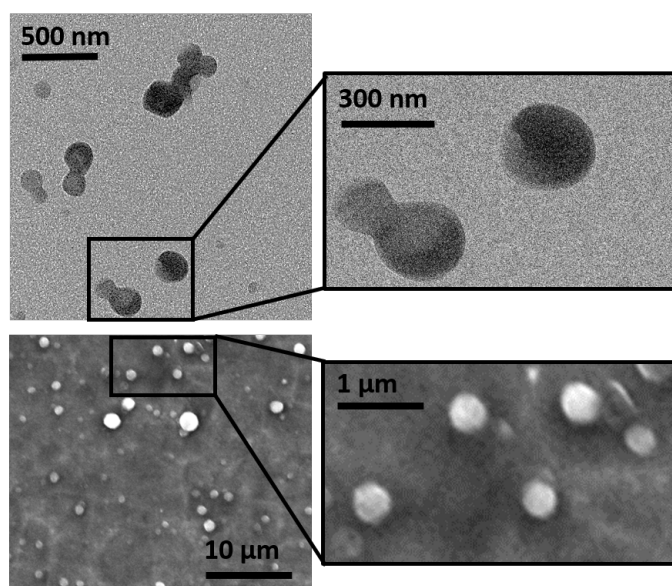


Figura 4.22: Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (arriba) y de barrido (abajo) de las SLPs sintetizadas.

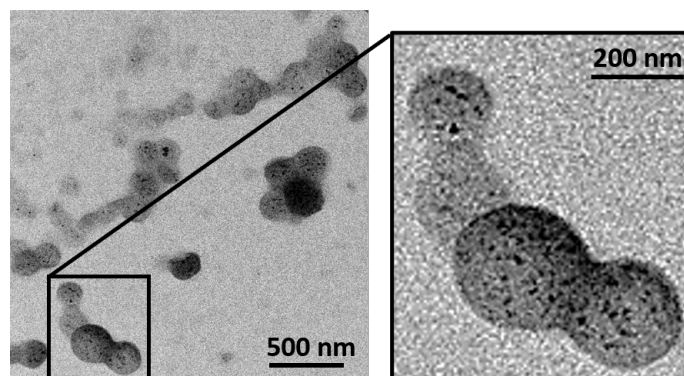


Figura 4.23: Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de las SLPs con nanopartículas de Fe_3O_4 @AO.

4.2.3. Eficiencia de encapsulación y perfil de liberación de las SLPs cargadas con enrofloxacin

Eficiencia de encapsulación de la enrofloxacin

Para medir la encapsulación de la enrofloxacin en las SLPs se empleó la técnica de espectroscopía UV-Visible, mediante un proceso indirecto, estimando la cantidad de fármaco no encapsulado frente al total. El cálculo de esta eficiencia de encapsulación se realizó en el laboratorio del Dr. Manuel Bañobre en el Instituto Ibérico Internacional de Nanotecnología en Braga, Portugal durante mi estancia predoctoral. Tras la estimación de dicha cantidad y empleando la ecuación de eficiencia de encapsulación (E.E. %), se determinó que esta fue de un $95,8 \% \pm 3,5$. Esto indica una alta carga de fármaco que es uno de los objetivos que se pretende alcanzar en la síntesis, ya que permite el empleo de una menor cantidad de ellas en posteriores estudios *in vitro* e *in vivo*. Esta alta encapsulación es esperada según los estudios realizados previamente (Sección 4.1.3 de Resultados), ya que la enrofloxacin al presentar una mayor naturaleza hidrófoba que la doxorrubicina, presenta más afinidad por la cera de *Carnauba*, y en consecuencia, se espera que haya una mayor eficiencia de encapsulación tal y como se observa en los datos obtenidos.

Ensayo de liberación *in vitro*

Rectas de calibrado de la enrofloxacin

Antes de comenzar con el estudio del perfil de liberación y con el objetivo de cuantificar la cantidad de enrofloxacin liberada en las SLPs, se realizó una recta de calibrado empleando diferentes disoluciones de concentración conocida de enrofloxacin en los mismos medios en los que se realizaron los ensayos *in vitro* de liberación (PBS) y medio lisosomal sintético [345].

En la Figura 4.24, a modo de ejemplo, se muestran los espectros de absorción de la enrofloxacin en medio lisosomal sintético mediante espectroscopía UV-Visible. Las rectas de calibrado y la posterior cuantificación se realizó mediante esta misma técnica a

una longitud de onda de 270 nm (PBS) (Fig. 4.25) y 277 nm (medio lisosomal) (Fig. 4.26). A concentraciones superiores a 3 $\mu\text{g/mL}$ de fármaco se pierde la linealidad de la recta de calibrado.

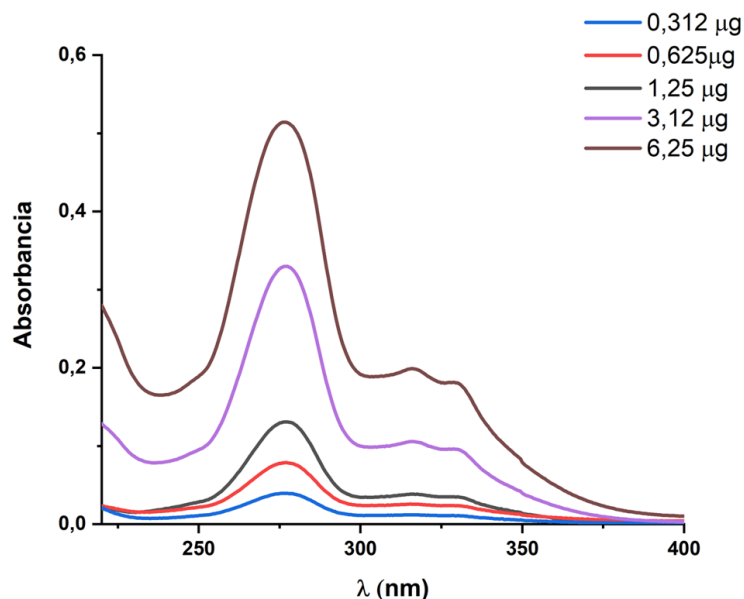


Figura 4.24: Espectros de absorción de la enrofloxacin en medio lisosomal sintético (pH= 4,5) para distintas concentraciones.

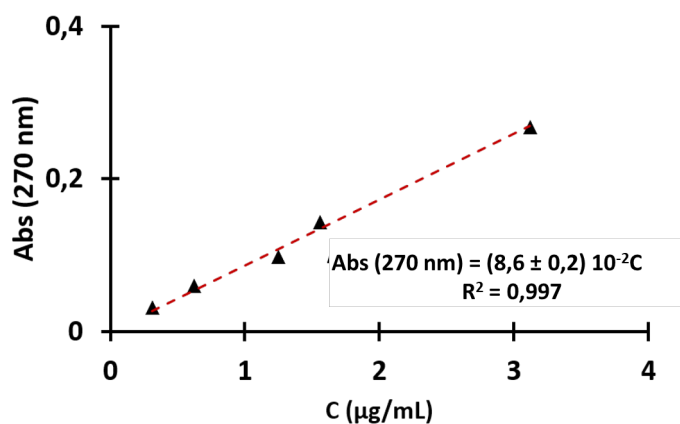


Figura 4.25: Representación gráfica de la recta patrón de la enrofloxacin obtenida midiendo la absorbancia de la enrofloxacin a 270 nm (PBS)). Se observa que en el rango de concentraciones se cumple la linealidad con unos valores de $R^2 = 0,99$.

Liberación de la enrofloxacin en PBS y en medio lisosomal

Para estudiar la liberación de la enrofloxacin de las SLPs *in vitro*, se estudió la liberación de dicho fármaco en dos medios diferentes, uno simulando las condiciones fisiológicas (pH = 7,4, 37 °C) y otro medio simulando condiciones endolisosomales (pH = 4,5, 37 °C). Para ello, se resuspendieron las partículas cargadas con enrofloxacin en PBS y en medio lisosomal sintético y se incubaron las muestras en rotación continua a 37°C dentro de una membrana de diálisis. La Figura 4.27 muestra cómo las SLPs presentan una fase inicial de liberación inmediata, donde aproximadamente un 12 % del fármaco

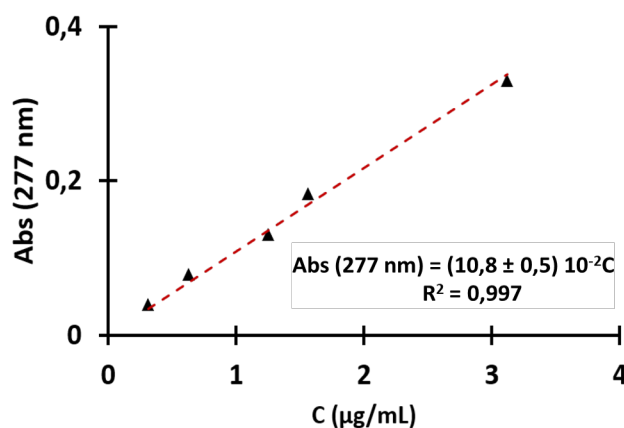


Figura 4.26: Representación gráfica de la recta patrón de la enrofloxacin midiendo la absorbancia de la enrofloxacin a 277 nm (medio lisosomal)). Se observa que en el rango de concentraciones se cumple la linealidad con unos valores de $R^2 = 0,99$.

encapsulado se libera en el medio durante las primeras 5 horas, mientras que en el caso del medio lisosomal esta liberación es menor (menos de un 10 % del fármaco se libera en las primeras 5 horas). Después de esta fase inicial, se observó un patrón de liberación sostenida del fármaco que duró unos 12 días, por lo que se puede concluir según estos datos que el perfil de liberación de la enrofloxacin muestra un modelo bifásico de la misma manera que ocurría con la doxorubicina previamente estudiada (Sección 4.1.3 Resultados). En el caso de la enrofloxacin, la primera fase de liberación (fase rápida o “burst release”) es menor en ambos medios de estudio si se compara con la doxorubicina y es que, según la hipótesis que se ha planteado previamente sobre la liberación bifásica de fármacos de estas SLPs, esta primera fase equivale a la cantidad de fármaco adherida a la superficie de la partícula y en el caso de la enrofloxacin esta cantidad no era significativa, ya que los datos de potencial zeta no presentaban variación considerable como en el caso de la doxorubicina. Este 12 y 10 % equivale al fármaco que se encuentra en superficie, siendo menor que si se compara con la doxorubicina, que en esta primera liberación representaba ≈ 30 % del fármaco liberado.

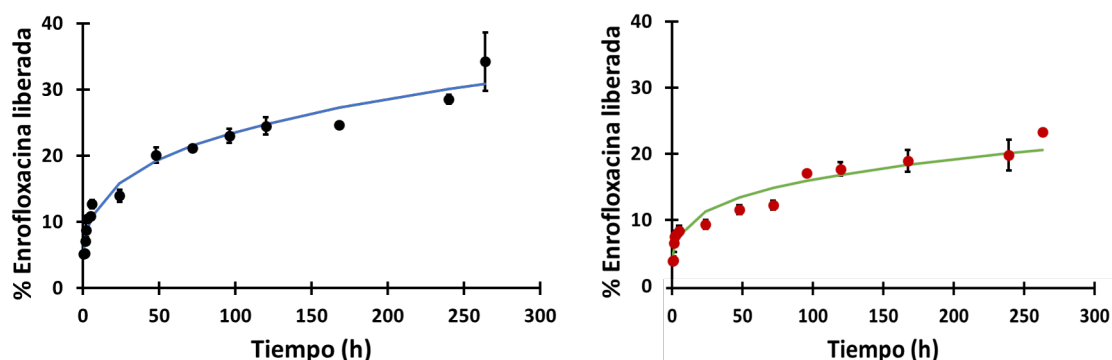


Figura 4.27: Ajuste al modelo cinético de Korsmeyer-Peppas de la liberación (%) de la enrofloxacin frente al tiempo en medio fisiológico (PBS) (izquierda) y en medio lisosomal (derecha).

Ajuste al modelo cinético de Korsmeyer-Peppas

Una vez obtenidos los datos de la liberación de la enrofloxacin en ambos medios de estudio se ajustaron, como en el caso de la doxorubicina previamente indicado (Sección 4.1.3 Resultados), al modelo cinético de *Korsmeyer-Peppas* [344] tal y como se muestra en la Figura 4.27, marcado con una línea en color azul en el perfil de liberación del fármaco en medio PBS y en color verde en la liberación de la enrofloxacin en medio lisosomal sintético. Al realizar el ajuste con este modelo, el valor del exponente de difusión n (Fig. 3.4) es de 0,27 y 0,25 para PBS y medio lisosomal, respectivamente. Este valor corroboró que el mecanismo de liberación del fármaco de la enrofloxacin de las SLPs fue por difusión siguiendo el modelo de Fick, ya que el valor del exponente de difusión n es $<0,5$ (Sección 3.3.6 de Materiales y Métodos). Estos resultados coinciden con otros sistemas basados en partículas de matriz lipídica descritos en otros trabajos [343, 372] o como en el estudio previo del perfil de liberación de la doxorubicina (Fig. 4.6).

4.2.4. Síntesis de liposomas cargados con cloranfenicol

Como segundo tipo de nanosistema lipídico se emplearon los liposomas. Los liposomas son vesículas artificiales, compuestas por una doble membrana fosfolipídica concéntrica que encierra compartimentos acuosos. Se utilizan en la administración de fármacos debido a su estructura versátil, a su biocompatibilidad y biodegradabilidad [388]. Estos sistemas de administración de fármacos son capaces de suministrar altas concentraciones de fármacos, así como una administración dirigida [389]. Un ejemplo de los beneficios que presentan estas nanovesículas es que las formulaciones de fármacos contra el cáncer que utilizan liposomas ya están aprobadas para el tratamiento en humanos [39]. En este trabajo, los liposomas se sintetizaron siguiendo el proceso de hidratación del *film* modificado descrito en la Sección de Materiales y Métodos (Fig. 3.3). Este procedimiento es uno de los métodos convencionales más usados para obtener nanovesículas liposomales y presenta ciertas ventajas con respecto a otros métodos de síntesis en los cuales es necesario el empleo de equipos más complejos o mayores infraestructuras [341]. Los liposomas se sintetizaron partiendo de un liofilizado comercial (Pronanosomes Lipo N) suministrado por la empresa Nanovex Biotechnologies S.L. Entre los componentes mayoritarios que forman estos liposomas se encuentra, por un lado, un fosfolípido encargado de formar las bicapas lipídicas concéntricas propias de la estructura de los liposomas y, por otro lado, el colesterol. El fosfolípido elegido es la fosfatidilcolina, uno de los más empleados en la formación de liposomas [148] por su biocompatibilidad y falta de toxicidad, así como por su similitud con las membranas lipídicas celulares [151]. El otro componente que forma la bicapa lipídica junto al fosfolípido es el colesterol. Este compuesto actúa uniéndose a la parte lipídica del liposoma “empaquetando” las cadenas fosfolipídicas, disminuyendo la fluidez de la bicapa y haciendo al liposoma menos permeable. De esta manera, el proceso de difusión del fármaco encapsulado desde el interior al exterior del liposoma es más sostenido en el tiempo [143]. Por todo esto, se puede concluir que el diseño de estos liposomas presenta un perfil biodegradable y biocompatible con un control en la liberación del fármaco encapsulado.

En este caso a la síntesis también se le añadió un colorante fluorescente (DiR) lipófilo para posteriores estudios de imagen como ya se ha explicado anteriormente. Los liposomas

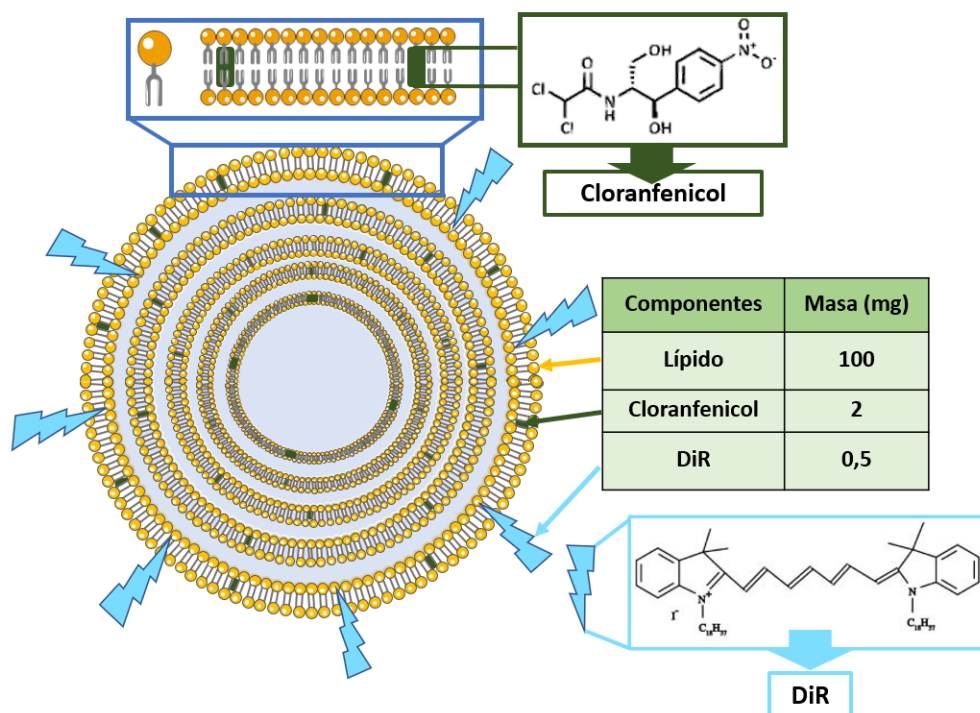


Figura 4.28: Esquema de los liposomas cargados con cloranfenicol sintetizados por el método de hidratación del film modificado.

se cargaron con el antibiótico cloranfenicol. Este fármaco de la familia de los fenicoles, presenta un amplio espectro de acción, pero no se encuentra como tratamiento de primera línea por los efectos adversos que produce. Estos efectos no deseados junto a su naturaleza lipofílica dotan a este fármaco de las propiedades adecuadas para ser transportado en un nanosistema y modular así su liberación, permitiendo un control de su toxicidad en su posterior uso en clínica [316]. Tras la síntesis de los liposomas y una vez se han formado las nanovesículas, se espera que el fármaco y el colorante (ambos con naturaleza hidrófoba) se encuentren en las zonas lipófilas del liposoma (bicapas lipídicas) (Fig. 4.28).

4.2.5. Caracterización de los liposomas

Potencial zeta y tamaño

En el caso de los liposomas cargados con cloranfenicol (Tabla 4.3) mostraron un potencial zeta negativo, sin un cambio significativo entre los liposomas control y los que están cargados con fármaco, posiblemente esto indique que el fármaco (con naturaleza hidrófoba) se encuentra encapsulado en su mayoría dentro del liposoma, más concretamente en la fracción lipídica tal y como se indica en la Figura 4.28. El diámetro hidrodinámico de los liposomas se encuentra dentro de un rango de aprox. 320-350 nm, no mostrando una diferencia significativa entre los liposomas con fármaco encapsulado de los que están sin

cargar. Esta medición del tamaño del diámetro de partícula mediante la técnica DLS, creemos que en el caso de los liposomas no muestra tanta fiabilidad como en el caso de otras nanopartículas, ya que estos liposomas están formados por membranas lipídicas concéntricas con espacios de naturaleza acuosa intercalados. Por esta estructura y composición presentan un índice de refracción de 1,45 muy parecido al del agua (1,33) (medio suspensión de los liposomas), por lo que esta medida en el caso de los liposomas debe considerarse orientativa y no definitiva [390].

Tabla 4.3: Medidas de potencial zeta y de tamaño de los liposomas cargados con cloranfenicol frente a los liposomas control.

Nanosistema	Potencial ζ (mV)	Tamaño (nm)
Liposomas	- 35 \pm 2	350 \pm 40
Liposomas-Cloranfenicol	- 32 \pm 1	323 \pm 14

Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Para la observación de los liposomas por microscopía electrónica de transmisión, fue necesaria una tinción negativa previa con acetato de uranilo al 2 % (Sección 3.2.3 de Materiales y Métodos) para generar la suficiente densidad electrónica como para ser observados por esta técnica de microscopía. Como puede observarse en la Figura 4.29, los liposomas presentan una morfología esférica característica de estos nanosistemas.

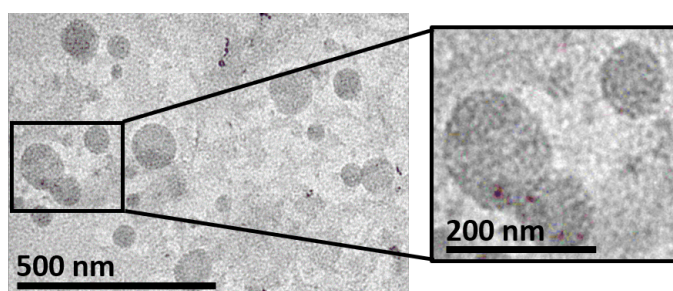


Figura 4.29: Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de los liposomas sintetizados.

4.2.6. Eficiencia de encapsulación y perfil de liberación de los liposomas cargados con cloranfenicol

Para medir la encapsulación del cloranfenicol en los liposomas se empleó también la técnica de espectroscopía UV-Visible, mediante un proceso directo en este caso, midiendo la cantidad de fármaco encapsulado frente al total. Tras determinar dicha cantidad y empleando la ecuación de eficiencia de encapsulación (E.E. %), se determinó que fue de

un $78,5 \pm 3,7$ %. Esta encapsulación es adecuada para el empleo de estos liposomas como vehiculizadores de fármacos en posteriores estudios *in vitro* e *in vivo*. Según los datos previamente mostrados de potencial zeta (Tabla 4.3), se puede concluir que la mayor parte del fármaco se encuentra encapsulado dentro del nanosistema.

Rectas de calibrado del cloranfenicol

Para cuantificar la cantidad de cloranfenicol liberada de los liposomas, se realizó una recta patrón empleando diferentes disoluciones de concentración conocida del antibiótico en los mismos medios en los que se realizaron los ensayos *in vitro* de liberación (PBS y en medio lisosomal sintético) [345], así como en metanol, ya que es el medio donde se determina la encapsulación del fármaco, tal y como se explica en la Sección 3.3.3. de Materiales y Métodos. En la Figura 4.30 se muestra, a modo de ejemplo, los espectros de absorción del cloranfenicol en metanol mediante espectroscopía UV-Vis. Para las medidas del antibiótico liberado en PBS y medio lisosomal, se empleó la misma técnica que en el estudio de la enrofloxacin, la espectroscopía UV-Visible, en este caso a partir de la absorbancia a una longitud de onda de 278 nm para ambos medios, que es donde presentan los máximos las bandas de absorción el fármaco. En las Figuras (4.31 y 4.32) se muestran ambas rectas de calibrado.

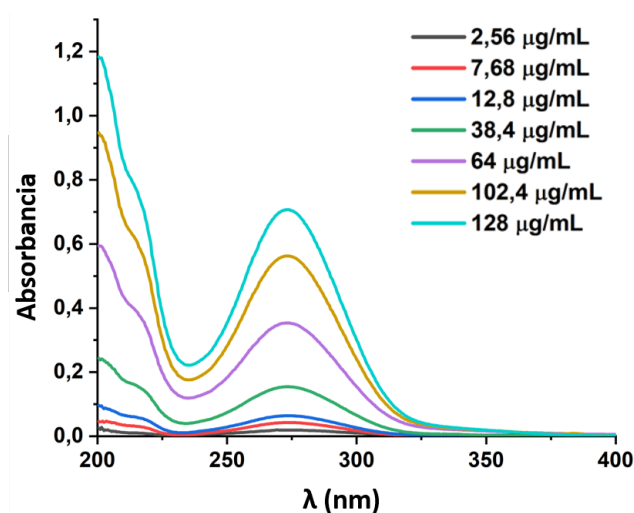


Figura 4.30: Espectros de absorción del cloranfenicol en metanol para distintas concentraciones.

Liberación del cloranfenicol en PBS y en medio lisosomal

Como ya se ha comentado previamente, los liposomas suelen presentar un perfil farmacocinético bifásico [370, 391, 392]. Para estudiar la liberación del cloranfenicol de los liposomas sintetizados *in vitro*, se estudió la liberación de dicho fármaco en dos medios diferentes, de la misma manera que en el estudio de la liberación de la enrofloxacin. La Figura 4.33 muestra cómo los liposomas también presentan una fase inicial de liberación rápida, donde aproximadamente un 50 % del fármaco encapsulado se libera en el medio durante las primeras 8 horas. Después de esta fase inicial, se observó una segunda fase prolongada en el tiempo durante 6 y 5 días (PBS y medio lisosomal, respectivamente) hasta la totalidad de la liberación del mismo, por lo que el perfil del cloranfenicol presenta una liberación en dos fases de la misma manera que ocurría con las SLPs (Fig. 4.6 y 4.27).

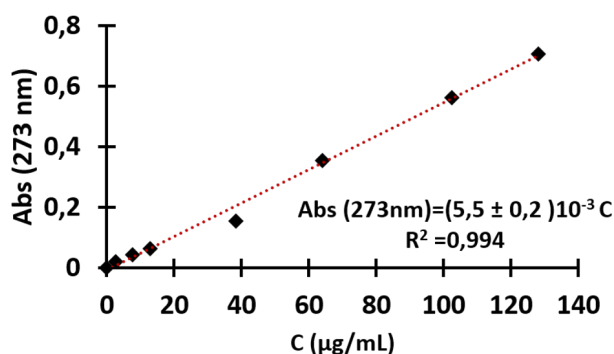


Figura 4.31: Recta de calibrado del cloranfenicol en metanol obtenida midiendo la absorbancia del cloranfenicol a 273 nm. Se observa que en el rango de concentraciones se cumple la linealidad con unos valores de $R^2 = 0,99$.

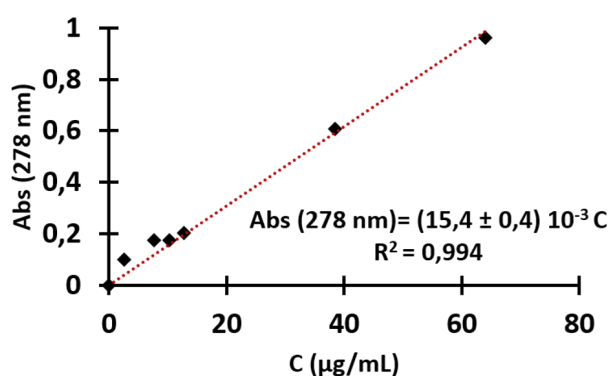


Figura 4.32: Recta de calibrado del cloranfenicol en los medios empleados en la liberación (PBS y medio lisosomal) obtenida midiendo la absorbancia del cloranfenicol a 278 nm. Se observa que en el rango de concentraciones se cumple la linealidad con unos valores de $R^2 = 0,99$.

En este caso la liberación es más rápida que en el estudio del otro nanosistema lipídico (SLPs) y durante la primera fase es mayor en cuanto a concentración de fármaco se refiere. Tras iniciar el ensayo, una cantidad de fármaco alta es liberada al medio. Si se atiende a la medida de potencial zeta previamente mostrada en la Sección 4.2.5 de Resultados y tal y como se ha hecho en el estudio de liberación de los dos experimentos previamente descritos (doxorrubicina y enrofloxacin), en los liposomas la diferencia de carga superficial entre las nanovesículas con y sin fármaco no varía significativamente, por lo que todo parece indicar que la liberación se produce por difusión del fármaco desde el liposoma hacia el medio (PBS o lisosomal) [393, 394].

Ajuste al modelo cinético de Korsmeyer-Peppas

Una vez obtenidos los datos de la liberación del cloranfenicol en ambos medios de estudio, se ajustaron (como en los casos anteriores) al modelo cinético de *Korsmeyer-Peppas* [344], tal y como se muestra en la Figura 4.33 marcado con una línea en color azul (PBS) y verde (medio lisosomal). A partir del ajuste, este modelo nos indica que el valor del exponente de difusión n (Fig. 3.4) es de 0,28 y 0,29 para los medios PBS y lisosomal, respectivamente.

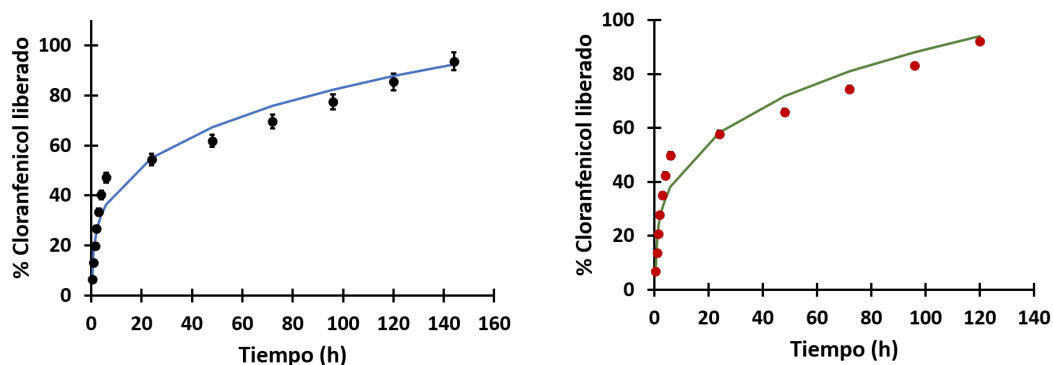


Figura 4.33: Ajuste al modelo cinético de Korsmeyer-Peppas de la liberación (%) del cloranfenicol frente al tiempo en medio fisiológico (PBS) (izquierda) y en medio lisosomal sintético (derecha).

Este valor corroboró que el mecanismo de liberación del fármaco del cloranfenicol de los liposomas fue por difusión siguiendo el modelo de Fick, ya que el valor del exponente de difusión n es $<0,5$ (Sección 3.3.6 de Materiales y Métodos). Estos resultados coinciden como ya se ha mencionado con otros sistemas basados en liposomas [371, 395, 396].

4.2.7. Interacción de los nanosistemas de transporte de fármacos sintetizados con macrófagos murinos

Con el fin de conocer cualitativamente cómo interaccionan los dos sistemas sintetizados (SLPs y liposomas) en un cultivo celular, se añadieron dichos nanosistemas a un cultivo celular de macrófagos murinos (J774.A1). Para llevar a cabo este estudio, se añadieron 4 $\mu\text{g/mL}$ de ambos nanosistemas (sin fármaco) por separado y a continuación se tomaron muestras del cultivo celular a diferentes tiempos (5, 24, 48 y 72 horas) para estudiar, de forma visual, cómo interaccionan las partículas con las células diana en función del tiempo. Como se ha explicado previamente (Sección 4.2.1 de Resultados), las partículas se sintetizaron con el colorante DiR. Al presentar este colorante internalizado en la partícula, estas se pudieron observar empleando la técnica de microscopía de fluorescencia confocal. A continuación en las Figuras 4.34 y 4.35, se muestran las imágenes obtenidas de los macrófagos murinos incubados con ambos nanosistemas a diferentes tiempos.

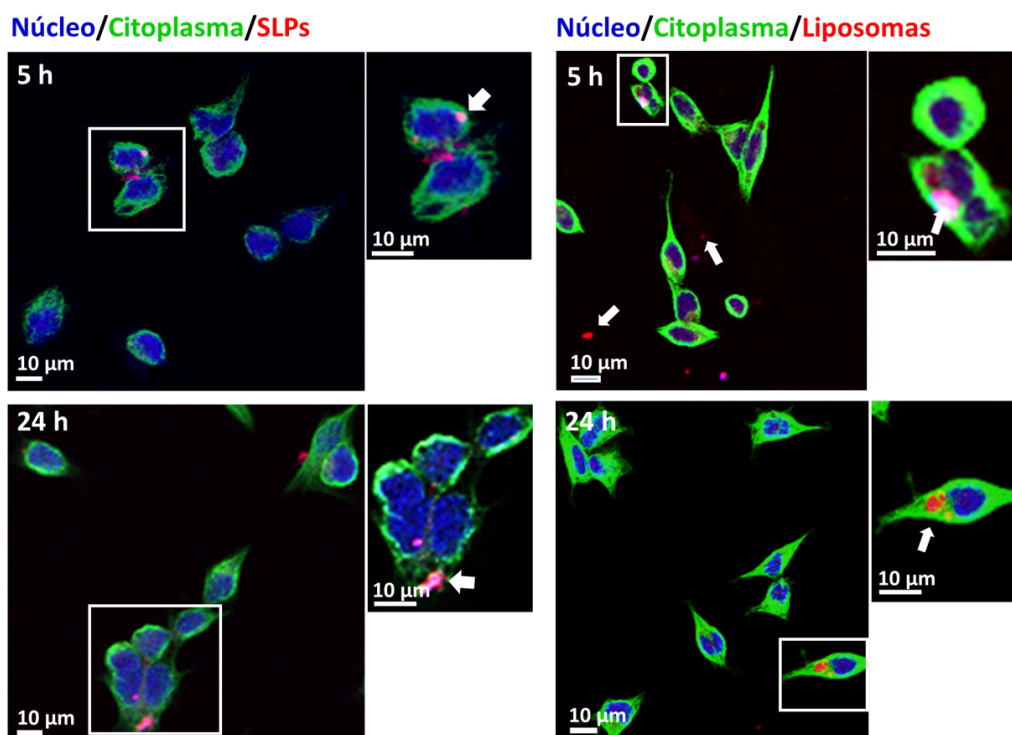


Figura 4.34: Imágenes de microscopía de fluorescencia confocal donde se muestra la interacción de las SLPs (izquierda) y de los liposomas sintetizados (derecha) en cultivos celulares de macrófagos murinos tras 5 y 24 horas de incubación.

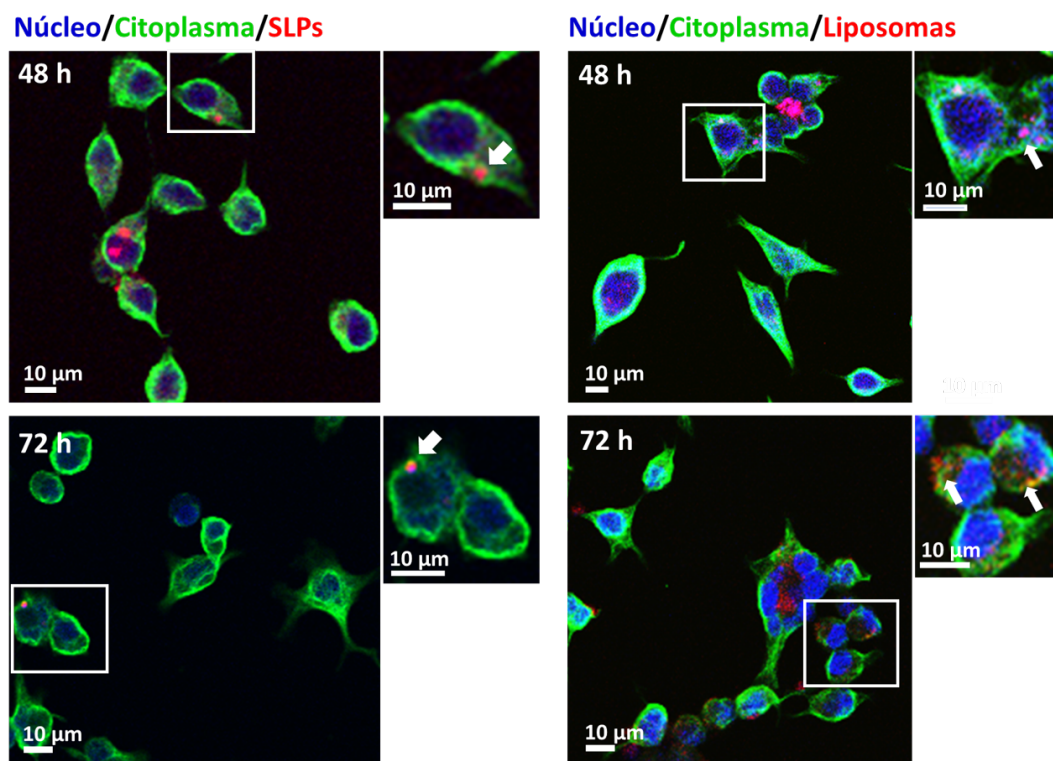


Figura 4.35: Imágenes de microscopía de fluorescencia confocal donde se muestra la interacción de las SLPs (izquierda) y de los liposomas sintetizados (derecha) en cultivos celulares de macrófagos murinos tras 48 y 72 horas de incubación.

Según muestran visualmente estos resultados (Fig. 4.34), ambos nanosistemas (liposomas y SLPs) interaccionan con la superficie celular de macrófagos murinos desde tiempos cortos (5 horas de incubación). En cultivos de más de 72 horas pueden observarse en color rojo en el citoplasma celular (Fig. 4.35).

4.2.8. Localización intracelular de las partículas sólidas lipídicas en macrófagos

Para complementar este estudio, en paralelo se realizó otro experimento para conocer la localización de estas partículas dentro de la célula mediante microscopía electrónica de transmisión en secciones ultrafinas de células. En este caso, el estudio sólo se realizó con uno de los nanosistemas desarrollados, las SLPs con nanopartículas de Fe_3O_4 @AO en su interior que sí presentaban contraste suficiente como para poder localizarlas en las muestras de estudio, como se observa en la Fig. 4.36, ya que es difícil diferenciar las SLPs en el interior celular, por presentar una morfología parecida a otros componentes celulares. Empleando estas técnicas pueden observarse las nanopartículas de Fe_3O_4 @AO en el citoplasma celular de macrófagos tras 24 y 72 horas de incubación con las SLPs.

4.2.9. Puesta a punto de un modelo de infección intracelular en cultivos celulares. Ensayos *in vitro* procariota-eucariota

Para poder conocer si los antibióticos encapsulados muestran mayor eficacia o disminuyen su toxicidad con respecto al fármaco convencional, buscamos un modelo de infección bacteriana intracelular adecuado. Como ya se ha descrito previamente en la Sección 1.7.1 de la Introducción, son muchas las bacterias con capacidad de infectar células y sobrevivir en su interior, evadiendo la acción del sistema inmune. En esta Tesis se ha elegido como modelo bacteriano intracelular a la bacteria *Listeria monocytogenes*. Este microorganismo presenta ventajas como rápido crecimiento e internalización rápida (≈ 3 horas) en las células de estudio (macrófagos murinos), permitiendo que los ensayos puedan hacerse con cierta rapidez. Además, para facilitar la capacidad de obtención de imágenes por microscopía de fluorescencia confocal, la cepa de *L. monocytogenes* empleada expresa un fluoróforo donde la fluorescencia es generada por un plásmido de expresión constitutivo de mCherry [349–351]. Esta cepa fue cedida a nuestro laboratorio por el Dr. Portnoy de la Universidad de Berkeley en California, EE.UU.

En la Figura 4.37 se muestra una representación del modelo de infección intracelular de macrófagos murinos con la bacteria *L. monocytogenes* que se ha empleado en esta Tesis. Una vez los macrófagos murinos son infectados por la bacteria, esta puede verse localizada en el interior celular tras 24 horas de incubación. Los nanosistemas estudiados en esta Tesis (liposomas y SLPs), también son observados en el interior celular tras 72 horas de incubación. En la Figura 4.37, a modo de ejemplo, se muestra en color blanco (c) las SLPs sintetizadas en el interior celular tras 72 horas de incubación con los macrófagos infectados con *L. monocytogenes*. Tanto la bacteria intracelular modelo como las SLPs se encuentran en el interior de la célula diana.

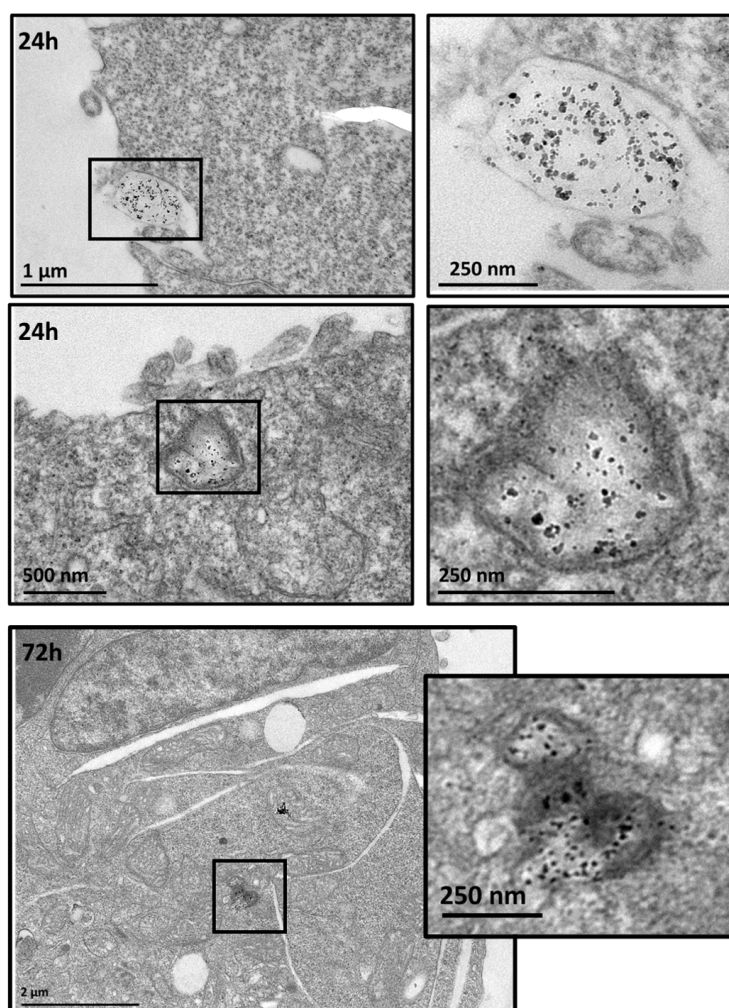


Figura 4.36: Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de macrófagos murinos con SLPs incubadas durante 24 y 72 horas.

4.2.10. Citotoxicidad de los nanosistemas cargados de antibiótico

Una vez puesto a punto el modelo de infección intracelular, el siguiente paso consistió en estudiar si los antibióticos encapsulados (enrofloxacina y cloranfenicol) disminuían su toxicidad si se encontraban encapsulados en los nanosistemas lipídicos elegidos. Como se ha demostrado previamente, la encapsulación de ambos fármacos en los dos nanosistemas contribuyó a modular el perfil farmacocinético mediante un control de la liberación, cuando los nanosistemas fueron expuestos a condiciones *in vitro* simulando condiciones fisiológicas (Sección 4.2.3 y 4.2.6 de Resultados). Como ya se ha mencionado, la toxicidad de estos fármacos aparece cuando la concentración del mismo es alta, ya que disminuyendo la dosis los efectos adversos remiten [316], pero al bajar la dosis, la concentración del antibiótico puede no ser la óptima para ejercer su efecto. Este problema se vuelve aún más acusado cuando se habla del tratamiento frente a infecciones intracelulares, ya que como se ha explicado previamente [292, 298], se pueden presentar diversas barreras que eviten la eficacia terapéutica del tratamiento. Para conocer si la encapsulación del antibiótico en un nanotransportador puede disminuir la toxicidad del fármaco, se estudió la viabilidad celular mediante el empleo del colorante vital Azul de Tripán, que tiñe principalmente células con la membrana celular dañada (células necróticas). Se investigó la posible toxicidad de las formulaciones sintetizadas comparándolas con el fármaco en solución (control

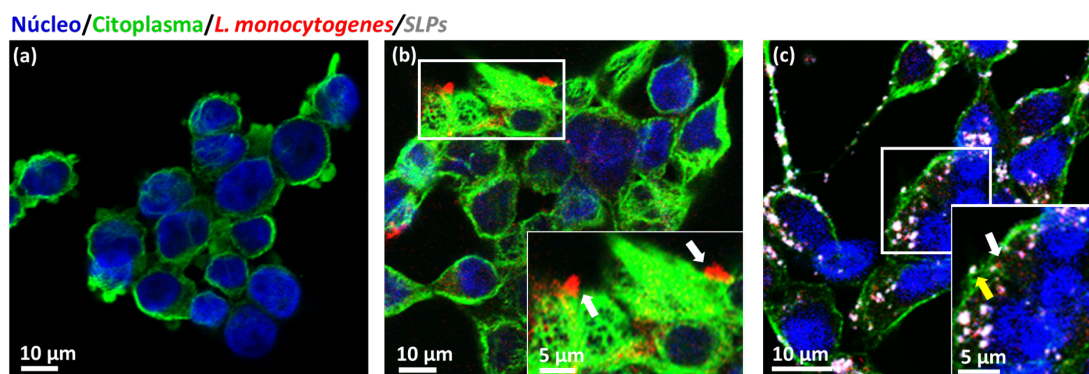


Figura 4.37: Imágenes de microscopía confocal de los cultivos procariota-eucariota. Las imágenes muestran cultivos celulares de macrófagos con sus núcleos teñidos en azul y citoplasma en verde. En (b) y (c) cultivados con *L. monocytogenes* (color rojo) que se encuentra en su citoplasma. (c) Macrófagos con *L. monocytogenes* y SLPs (en color blanco). Las bacterias y las partículas se encuentran localizadas en el interior celular, señaladas con flechas blancas y amarillas, respectivamente.

positivo) y con los nanosistemas sin cargar (control negativo) tras 72 horas de exposición. Se administró una concentración de 150 $\mu\text{g/mL}$ de enrofloxacin a los macrófagos tanto encapsulado en SLPs como libre. La Figura 4.38 muestra cómo el fármaco vehiculizado en la SLPs presenta una tendencia a mostrar una menor toxicidad que el fármaco libre, aunque dicha diferencia no es estadísticamente significativa. Esta concentración de fármaco se eligió porque es necesaria una concentración alta que genere toxicidad celular para cumplir el objetivo de estos ensayos. En el caso de los liposomas, los cultivos celulares J774 también se expusieron a 150 $\mu\text{g/mL}$ de cloranfenicol durante 72 horas (Fig. 4.39). Así como en el caso de las SLPs, la diferencia en el porcentaje de viabilidad no fue estadísticamente significativo, el efecto citotóxico del cloranfenicol encapsulado en liposomas sí se redujo significativamente con respecto al fármaco en solución. Esta concentración de fármaco se eligió por el mismo motivo que se ha indicado en el experimento anterior.

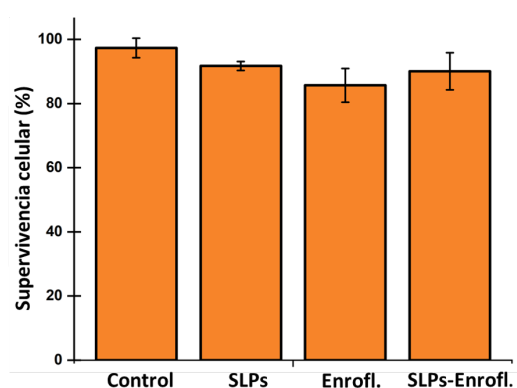


Figura 4.38: Cuantificación de la supervivencia celular tras 72 horas de tratamiento con la enrofloxacin encapsulada en las SLPs con respecto al fármaco en solución y los correspondientes controles, empleando la técnica de exclusión con Azul de Tripán. Cada punto representa la media \pm desviación estándar de tres experimentos.

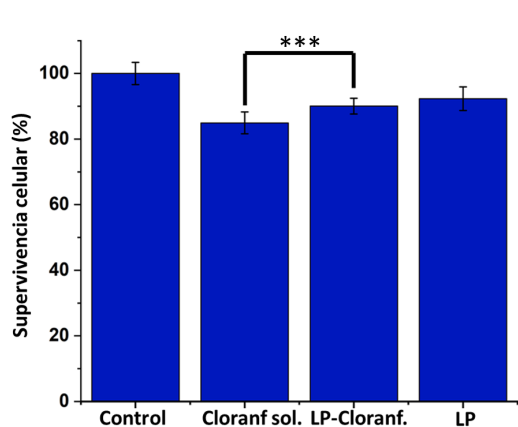


Figura 4.39: Cuantificación de la supervivencia celular tras 72 horas de tratamiento con el cloranfenicol encapsulado en los liposomas con respecto al fármaco en solución y los correspondientes controles, empleando la técnica de exclusión con Azul de Tripán ($t=3, 24$; $n=6$; *** t_{99}). Cada punto representa la media \pm desviación estándar de tres experimentos.

Como ya se ha descrito en diferentes estudios [127, 128] y muestran los resultados presentados, la tolerancia celular ha mejorado cuando el fármaco ha ido encapsulado en el nanotransportador. Este hecho probablemente se deba a la liberación sostenida del fármaco desde el nanosistema, evitando la toxicidad producida por dosis altas de fármaco.

4.2.11. Eficacia terapéutica de los nanosistemas cargados de antibiótico *in vitro*.

Una vez observada la disminución de la toxicidad producida por los fármacos cuando se encuentran encapsulados en nanotransportadores de base lipídica, en paralelo y empleando las mismas concentraciones de fármaco en ambos casos, se realizó un estudio para conocer *in cellulo* si mejoraba o no la eficacia terapéutica de los antibióticos cuando se encontraban vehiculizados en los nanosistemas sintetizados. Para ello, se partió de una infección previa de cultivos de macrófagos infectados con la bacteria modelo *I. monocytogenes* descrita en la Sección 4.2.9 de Resultados. El diseño de infección y posterior tratamiento con los antimicrobianos encapsulados en los nanosistemas de base lipídica siguió el mismo procedimiento explicado previamente en la Sección 3.5.4 de Materiales y métodos.

Tras conseguir la infección bacteriana y haber administrado los respectivos tratamientos, se realizaron cultivos bacterianos de las bacterias intracelulares con el fin de conocer las UFC en cada uno de los casos. Para ello se lisaron los macrófagos, se cultivaron dichas bacterias en placas de Petri con medio BHI-agar y se esperó hasta observar el crecimiento bacteriano. Cuando se observó crecimiento de colonias bacterianas en los cultivos tras 24-48 horas, se cuantificó el número de colonias como UFCs/mL, es decir, el número mínimo de células separables sobre la superficie del medio BHI-agar que da lugar al desarrollo de una colonia visible. Tras la cuantificación de las colonias obtenidas como UFCs/mL por los diferentes controles y tratamientos a las 72 horas se observaron los resultados recogidos en las Figuras 4.40 y 4.41.

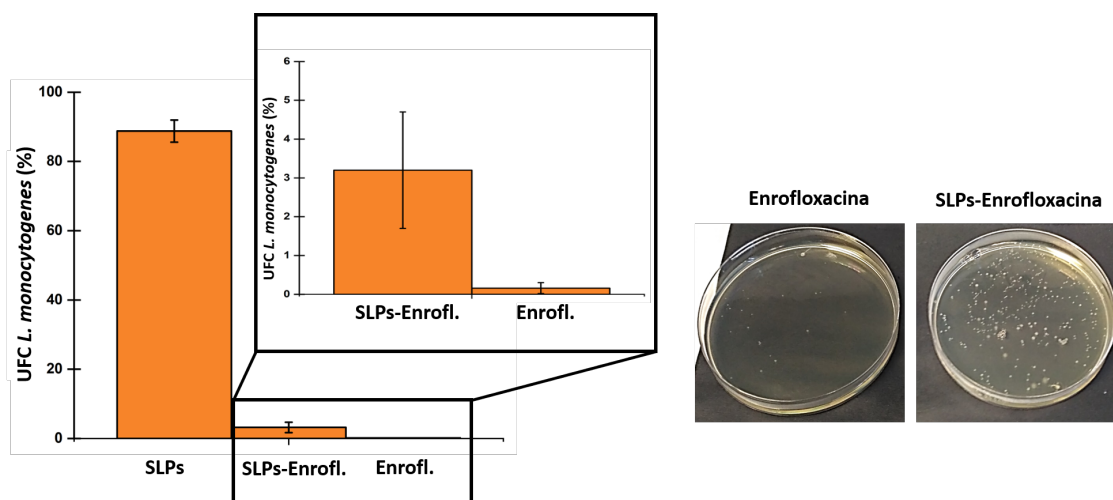


Figura 4.40: Cuantificación de la supervivencia intracelular de *L. monocytogenes* después del tratamiento con las diferentes formulaciones a una concentración de 150 µg/mL de fármaco, durante 72 horas (%). Los resultados están estandarizados considerando la muestra sin tratar como 100 %.

Como se puede observar en el caso de la eficacia de la enrofloxacin encapsulada en las SLPs (Fig. 4.40), a las 72 horas de experimento no se aprecia una mejora en la eficacia del antibiótico frente a la bacteria al compararla con la eficacia del fármaco en solución. La posible hipótesis de que el fármaco encapsulado no haya mejorado su eficacia en estos ensayos *in vitro* puede deberse al hecho de que la tasa de liberación de la enrofloxacin de estas SLPs es muy sostenida en el tiempo (Fig. 4.27) debido a la afinidad que muestra este fármaco por la matriz hidrófoba que constituye la partícula, y estos ensayos, al tratarse de estudios a corto plazo (72 horas), el fármaco en solución muestre una mayor eficacia en este caso. No ocurre así en el caso de los liposomas encapsulando cloranfenicol (Fig. 4.41), donde sí se aprecia una mejora en la eficacia antibacteriana cuando el fármaco se encuentra encapsulado frente al fármaco en solución. Si centramos nuestra hipótesis en la tasa de liberación del fármaco, en el caso de los liposomas también presentan una liberación bifásica (Fig. 4.33), pero esta es más rápida y la fase inicial libera más concentración de fármaco, por lo que confirma la idea de que a corto plazo una liberación prolongada en el tiempo puede no suponer una mejora en la eficacia de los antibióticos encapsulados. Sin embargo, ya que el objetivo y posterior aplicación de estos nanosistemas es el tratamiento de infecciones intracelulares que se cronifican en el tiempo, pensamos que el potencial de estos nanosistemas sí que mostraría resultados exitosos en períodos de tiempo más largos.

Existen estudios previos que ya han mostrado cómo la encapsulación en nanosistemas de base lipídica de otros antibióticos han mejorado su eficacia y han disminuido su toxicidad [292,302], y más concretamente en el tratamiento de infecciones intracelulares, en las cuales la falta de eficacia terapéutica de los antibióticos de primera línea es más acusada debido a la dificultad de llegada del fármaco y la posterior retención en la zona de acción para que el tratamiento sea efectivo [298]. En esta Tesis se ha demostrado que la encapsulación de ambos fármacos ha sido adecuada consiguiéndose altos niveles de carga de fármaco y se ha mejorado el perfil de liberación en ambos casos. El empleo de dos tipos de nanosistemas ha permitido estudiar y lograr dos perfiles de liberación diferentes, ambos sostenidos en el tiempo y de tipo bifásico. Por un lado, la enrofloxacin (con acción

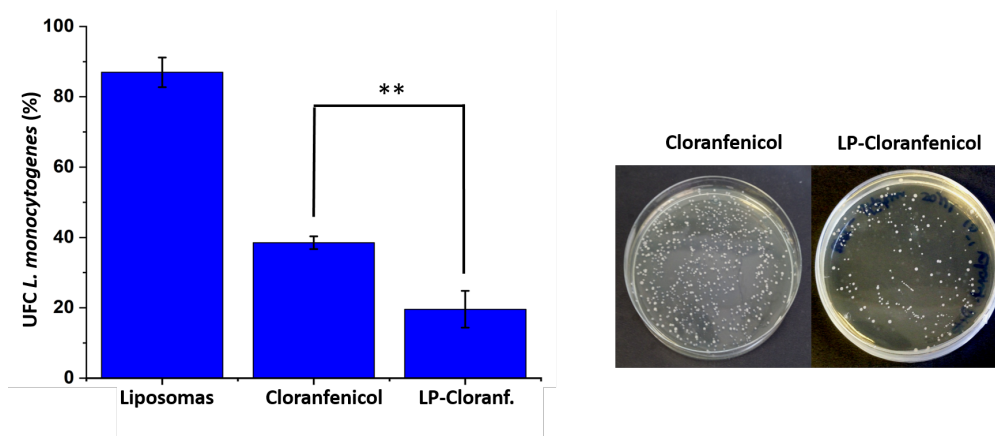


Figura 4.41: Cuantificación de la supervivencia intracelular de *L. monocytogenes* después del tratamiento con las diferentes formulaciones a una concentración de 150 $\mu\text{g/mL}$ de fármaco, durante 72 horas (%) ($t = 5, 12$; $n = 6$; ** $t_{99.5}$). Los resultados están estandarizados considerando la muestra sin tratar como 100 %.

bactericida que actúa frente a la síntesis de ADN, evitando su replicación) presenta una liberación sostenida en el tiempo con una fase inicial no muy rápida, lo que implica que el fármaco es liberado poco a poco mediante difusión (Fig. 4.27) desde la matriz de cera de la SLP. Además, esta liberación es sostenida en el tiempo, pero permite que en todo momento la concentración esté por encima de la concentración mínima eficaz del fármaco actuando frente a la bacteria intracelular (Fig. 4.40). Este hecho se consigue gracias a la alta encapsulación del fármaco de $>90\%$. Por otro lado, el cloranfenicol (con acción bacteriostática que actúa frente a la síntesis de proteínas) presenta una liberación sostenida en el tiempo, pero en este caso la liberación inicial es más rápida y se libera una mayor cantidad de fármaco que en el caso de la enrofloxacin. Este hecho es intrínseco de los liposomas convencionales [397].

El empleo de ambos nanosistemas encapsulando dos antibióticos con perfiles diferentes puede arrojar buenos resultados en el tratamiento de infecciones intracelulares en posteriores ensayos *in vivo*. Previamente se ha demostrado la eficacia mejorada de estos nanosistemas cuando han sido testados en ratones frente a un modelo de metástasis pulmonar (Fig. 4.14), y cómo este perfil de liberación sostenido (Fig. 4.19) en el tiempo ha sido, junto con la acumulación de las SLPs-DOX en el pulmón, la combinación adecuada para generar un 60 % más de inhibición tumoral que el fármaco convencional. Además, en los ensayos de biodistribución se ha observado una acumulación alta en bazo e hígado, los órganos más afectados por acumulación microbiana en las infecciones intracelulares [398]. Por lo que no sólo se lograría modular y mejorar el perfil farmacocinético de estos antimicrobianos, sino que esta liberación se produciría en los órganos más afectados por acumulación del patógeno. Por todos estos motivos, los nanosistemas sintetizados presentan una serie de características que *a priori* muestran un fuerte potencial en el tratamiento frente a infecciones intracelulares.

En conclusión, en este estudio se ha demostrado que el diseño de estos nanosistemas de base lipídica, encapsulando enrofloxacin y cloranfenicol, han mejorado el perfil farmacocinético de estos fármacos que no se emplean en clínica o cuyo uso se encuentra muy restringido, además de mostrar una disminución de su toxicidad *in vitro* (Figs.

4.38 y 4.39) si se compara con el fármaco libre. Estos resultados convierten a estos nanotransportadores de fármacos en vehiculizadores potencialmente útiles para posteriores ensayos *in vivo* en el tratamiento de infecciones intracelulares.

Conclusions

The conclusions of this Doctoral Thesis are:

Chapter I: Treatment of lung metastasis:

1. Doxorubicin release showed a biphasic diffusion mechanism, consisting of a rapid release, an initial phase with 30 % of drug released, and a subsequent sustained period of ≈ 70 %. This result was corroborated in murine melanoma cell cultures by *in vitro* tests.
2. In mouse models, SLPs-DOX appear in the lung tissue 3 hours after intravenously administration. ICP studies showed particles are widely distributed with greater accumulation in the spleen and liver.
3. SLPs-DOX showed a 60 % inhibition of lung metastasis compared to conventional drug treatments in the mouse model. These particles showed improved biocompatibility compared to the free drug.
4. SLPs-DOX did not improve the antimetastatic effect of the free drug when administered intravenous simultaneously to melanoma cells.

Chapter II: Nanosystems in the treatment of intracellular infections:

1. Two lipid nanosystems have been developed, liposomes and SLPs, to encapsulate chloramphenicol and enrofloxacin, respectively.
2. The encapsulation efficiency of both drugs were higher than 95 % for enrofloxacin and 78 % for chloramphenicol.
3. The release profile of both drugs has been fitted using the Korsmeyer-Peppas kinetic model, indicating a biphasic diffusion release mechanism, but showed significant differences in the drug release rate.
4. Both drugs (chloramphenicol and enrofloxacin) showed improved biocompatibility when encapsulated in the lipid nanosystems. This improvement is due to the control of drug release from the nanocarrier.
5. Chloramphenicol encapsulated in liposomes improved its therapeutic efficacy by approx. 20 % compared to free drug in *in vitro* studies.
6. Encapsulated enrofloxacin did not improve its efficacy relative to drug in solution in *in vitro* studies.

Perspectivas Futuras

Los siguientes pasos de este estudio consistirían en testar la eficacia de los nanosistemas lipídicos (liposomas y SLPs) cargados con los dos antibióticos (cloranfenicol y enrofloxacin) frente a infecciones intracelulares. Como ensayos preliminares, se han empezado los experimentos de búsqueda de un modelo murino adecuado para generar la infección intracelular, y posteriormente, tratarla con los antibióticos encapsulados en los nanotransportadores sintetizados. Este modelo se basa en emplear ratones adultos (de unas 12-16 semanas de vida) de la cepa C57BL/6. Para ello se diseñó el experimento descrito en la Figura 6.1. Éste consistiría en inyectar por vía i.p. una concentración determinada de *Listeria monocytogenes* acompañada de los nanosistemas portadores de antibióticos. Tras un periodo de infección de 3 días, los animales se sacrifican y se examina la capacidad de infección de las bacterias en presencia o no de las nanopartículas. El efecto de los nanosistemas se cuantificaría a continuación en UFCs/mL, tal y como se ha explicado previamente.

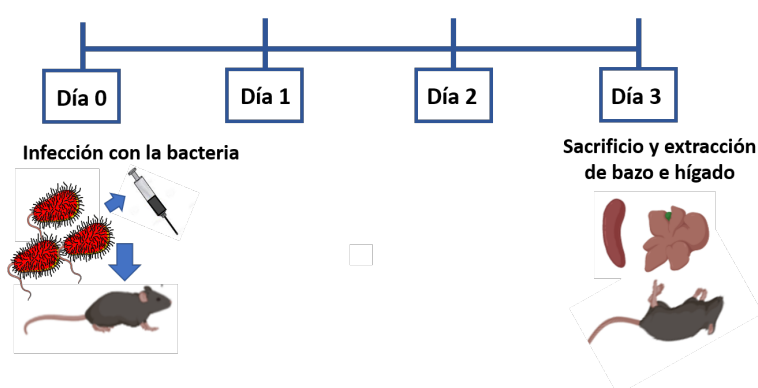


Figura 6.1: Diseño de infección intracelular con la bacteria modelo *L. monocytogenes* en ratones.

En el modelo se inyecta a día 0 el inóculo bacteriano a cada ratón y a los tres días post-inoculación se sacrifican los ratones y se extraen bazo e hígado, por ser los

órganos donde se encuentra mayoritariamente esta bacteria. A continuación, mediante un procesamiento de disgregación de los respectivos órganos y de lisis celular, se recuperaron las bacterias intracelulares y se cultivaron en placas de BHI-agar (24-48 horas; 37 °C). Por último, se cuantificaron las colonias de bacterias como UFCs/mL [399, 400]. Este procedimiento se realizó en 18 ratones y se concluyó que tras una administración de 10 UFCs/mL a cada ratón tras tres días de infección, la supervivencia de los ratones durante el estudio fue del 100 % y con una infección bacteriana en bazo e hígado de $\approx 10^5$ UFC/mL en ambos órganos. Para observar estas infecciones visualmente, se realizaron criosecciones en fresco de 15 μm de los hígados y bazos extraídos a los 3 días, se tiñeron los núcleos con el colorante Hoestch y se observaron las preparaciones empleando microscopía confocal de fluorescencia.

En estudios preliminares de este modelo se observaron, tanto en bazo (Fig. 6.2) como en hígado (Fig. 6.3), la bacteria *L. monocytogenes* debido a la fluorescencia característica de color rojo que emite y que se ha descrito previamente en la sección 3.5.1 de Materiales y Métodos.

Núcleo/*L. monocytogenes*

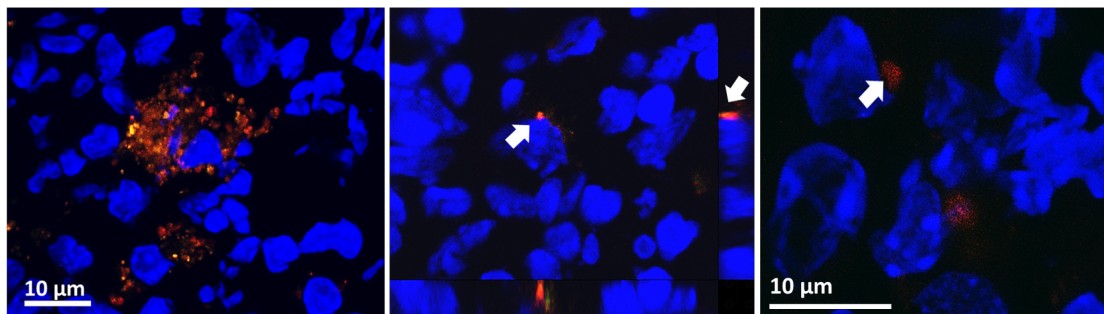


Figura 6.2: Imágenes de microscopía confocal de criosecciones de bazo de ratón infectado con la bacteria *L. monocytogenes* tras tres días post-inoculación.

Núcleo/*L. monocytogenes*

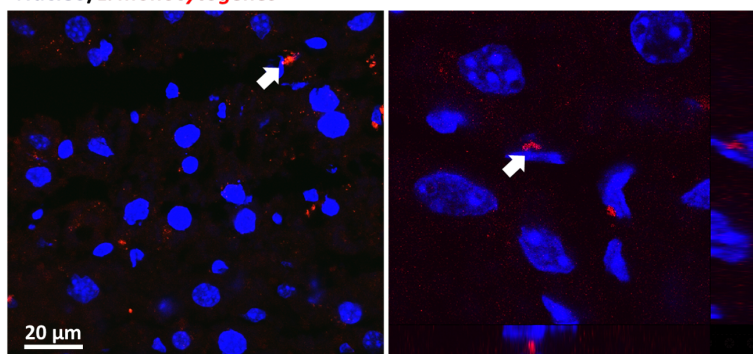


Figura 6.3: Imágenes de microscopía confocal de criosecciones de hígado de ratón infectado con la bacteria *L. monocytogenes* tras tres días post-inoculación.

El objetivo de este estudio es conocer la eficacia terapéutica de los nanosistemas sintetizados en el tratamiento de infecciones intracelulares como la listeriosis que son de carácter crónico. Por ello, el siguiente paso sería conocer si esta infección se podría alargar en el tiempo. Para ello, se inyectó la misma cantidad de UFCs/mL (10 UFCs/mL/ratón)

y se siguió el mismo procedimiento, pero esta vez se sacrificaron los ratones 7 días post-inoculación. Tras este tiempo, se consiguió $\approx 10^6$ UFC/mL en hígado y bazo de los ratones infectados. La continuación de estos estudios se vio paralizada debido al comienzo de la pandemia provocada por la Covid-19 en el año 2020 y, en consecuencia, el posterior estado de alarma que impidió finalizar este trabajo.

Los siguientes estudios deberían seguir este diseño con el fin de obtener una infección intracelular crónica en bazo e hígado de estos ratones y, posteriormente, administrar los tratamientos antibióticos transportados en los nanosistemas estudiados en esta Tesis Doctoral. Las perspectivas sobre futuros resultados del testado de las partículas en ratones infectados con listeriosis presenta un gran potencial tras los resultados obtenidos, ya que se podría lograr un tratamiento controlado en el tiempo, administrando fármacos no empleados habitualmente por su toxicidad a dosis altas y logrando que este fármaco sea liberado *in situ* donde se encuentra la bacteria, ya que se ha mostrado que los nanosistemas se acumulan principalmente en los órganos diana de esta enfermedad.

CAPÍTULO 6.
PERSPECTIVAS
FUTURAS

Artículos

- **Lourdes Valdivia**, Lorena García-Hevia, Manuel Bañobre-López, Juan Gallo, Rafael Valiente, Mónica López-Fanarraga. Solid lipid particles for lung metastasis treatment. *Pharmaceutics*. 2021, 13(1):93. Doi: 10.3390/pharmaceutics13010093
- Padín-González, E.; Navarro-Palomares, E.; **Valdivia, L.**; Iturrioz-Rodríguez, N.; Correa, M.A.; Valiente, R.; Fanarraga, M.L. A custom-made functionalization method to control the biological identity of nanomaterials. *Nanomedicine*. 2020(29):102268. Doi: 10.1016/j.nano.2020.102268
- Eloísa González-Lavado, **Lourdes Valdivia**, Almudena García-Castaño, Fernando González, Carmen Pesquera, Rafael Valiente-Barroso; Mónica López Fanarraga. Multi-walled carbon nanotubes complement the anti-tumoral effect of 5-Fluorouracil. *Oncotarget*. 2019, 10(21): 2022 - 2029. Doi: 10.18632/oncotarget.26770
- Carlos Renero-Lecuna, Nerea Iturrioz-Rodríguez, Eloísa González-Lavado, Esperanza Padín-González, Elena Navarro-Palomares, **Lourdes Valdivia-Fernández**, Lorena García-Hevia, Mónica López-Fanarraga, Lorena González-Legarreta. Effect of size, shape, and composition on the interaction of different nanomaterials with HeLa cells. *Journal of Nanomaterials*. 2019(28):1-11. Doi: 10.1155/2019/7518482

Referencias

- [1] Feynman, R. There's plenty of room at the bottom. *Engineering and Science* **23**, 22–36 (1960).
- [2] Taniguchi, N. *On the basic concept of "Nano-Technology"* (Japan Society of Precision Engineering, 1974).
- [3] Holdren, J. National nanotechnology initiative strategic plan. *National Science Technology Council (NSTC), Arlington* (2016).
- [4] Cheng, L., Jiang, X., Wang, J., Chen, C. y Liu, R. Nano–bio effects: interaction of nanomaterials with cells. *Nanoscale* **5**, 3547–3569 (2013).
- [5] Gupta, A., Eral, H. B., Hatton, T. A. y Doyle, P. S. Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Soft Matter* **12**, 2826–2841 (2016).
- [6] Runa, S., Hussey, M. y Payne, C. Nanoparticle–cell interactions: Relevance for public health. *The Journal of Physical Chemistry B* **122**, 1009–1016 (2017).
- [7] Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M. y Rizzolio, F. The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical–physical applications to nanomedicine. *Molecules* **25**, 112; 1–15 (2019).
- [8] Contera, S., de la Serna, J. y Tetley, T. Biotechnology, nanotechnology and medicine. *Emerging Topics in Life Sciences* **4**, 551–554 (2020).
- [9] Freitas, R. What is nanomedicine? *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **1**, 2–9 (2005).
- [10] Duncan, R. y Gaspar, R. Nanomedicine(s) under the microscope. *Molecular Pharmaceutics* **8**, 2101–2141 (2011).
- [11] Patra, J. *et al.* Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology* **16**, 1–33 (2018).
- [12] Huang, X., Liu, Y., Yung, B., Xiong, Y. y Chen, X. Nanotechnology-enhanced no-wash biosensors for in vitro diagnostics of cancer. *ACS Nano* **11**, 5238–5292 (2017).
- [13] El-Sayed, A. y Kamel, M. Advances in nanomedical applications: diagnostic, therapeutic, immunization, and vaccine production. *Environmental Science and Pollution Research* **27**, 19200–19213 (2019).

- [14] Janib, S., Moses, A. y MacKay, J. Imaging and drug delivery using theranostic nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews* **62**, 1052–1063 (2010).
- [15] Dadfar, S. *et al.* Iron oxide nanoparticles: Diagnostic, therapeutic and theranostic applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* **138**, 302–325 (2019).
- [16] Langbein, T., Weber, W. y Eiber, M. Future of theranostics: An outlook on precision oncology in nuclear medicine. *Journal of Nuclear Medicine* **60**, 13S–19S (2019).
- [17] Zor, F., Selek, F., Orlando, G. y Williams, D. Biocompatibility in regenerative nanomedicine. *Nanomedicine* **14**, 2763–2775 (2019).
- [18] El-Aneed, A. An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. *Journal of Controlled Release* **94**, 1–14 (2004).
- [19] Yang, M. y Frokjaer, S. In Jorgensen, L. y Nielson, H. (eds.) *Delivery technologies for biopharmaceuticals: peptides, proteins, nucleic acids and vaccines* (John Wiley & Sons, 2009).
- [20] Farjadian, F. *et al.* Temperature and pH-responsive nano-hydrogel drug delivery system based on lysine-modified poly (vinylcaprolactam). *International Journal of Nanomedicine* **14**, 6901–6915 (2019).
- [21] Mauricio, M. *et al.* Nanoparticles in medicine: A focus on vascular oxidative stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2018**, 1–20 (2018).
- [22] Wahid, F., Khan, T., Shehzad, A., Ul-Islam, M. y Kim, Y. Y. Interaction of nanomaterials with cells and their medical applications. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **14**, 744–754 (2014).
- [23] Kabanov, A., Lemieux, P., Vinogradov, S. y Alakhov, V. Pluronic® block copolymers: novel functional molecules for gene therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* **54**, 223–233 (2002).
- [24] Bobo, D., Robinson, K., Islam, J., Thurecht, K. y Corrie, S. Nanoparticle-based medicines: A review of FDA-approved materials and clinical trials to date. *Pharmaceutical Research* **33**, 2373–2387 (2016).
- [25] Anselmo, A. y Mitragotri, S. Nanoparticles in the clinic: An update. *Bioengineering & Translational Medicine* **4**, e10143; 1–16 (2019).
- [26] Kumari, A., Kumarand, V. y Yadav, S. Nanotechnology: a tool to enhance therapeutic values of natural plant products. *Trends in Medical Research* **7**, 34–42 (2012).
- [27] Soppimath, K., Aminabhavi, T., Kulkarni, A. y Rudzinski, W. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release* **70**, 1–20 (2001).
- [28] Vinogradov, S., Bronich, T. y Kabanov, A. Nanosized cationic hydrogels for drug delivery: preparation, properties and interactions with cells. *Advanced Drug Delivery Reviews* **54**, 135–147 (2002).
- [29] Mirza, A. y Siddiqui, F. Nanomedicine and drug delivery: a mini review. *International Nano Letters* **4**, 94; 1–7 (2014).

- [30] Celia, C., Cosco, D., Paolino, D. y Fresta, M. Gemcitabine-loaded innovative nanocarriers vs GEMZAR: Biodistribution, pharmacokinetic features and in vivo antitumor activity. *Expert Opinion on Drug Delivery* **8**, 1609–1629 (2011).
- [31] Florence, A. “Targeting” nanoparticles: The constraints of physical laws and physical barriers. *Journal of Controlled Release* **164**, 115–124 (2012).
- [32] Mahapatro, A. y Singh, D. Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. *Journal of Nanobiotechnology* **9**, 55–65 (2011).
- [33] Yang, R., Chang, L., Yang, C. y Lin, P. Pharmacokinetics and physiologically-based pharmacokinetic modeling of nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **10**, 8482–8490 (2010).
- [34] Hall, J., Dobrovolskaia, M., Patri, A. y McNeil, S. Characterization of nanoparticles for therapeutics. *Nanomedicine* **6**, 789–803 (2007).
- [35] Ventola, C. Progress in nanomedicine: approved and investigational nanodrugs. *Pharmacy and Therapeutics* **42**, 742–755 (2017).
- [36] Sainz, V. *et al.* Regulatory aspects on nanomedicines. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **468**, 504–510 (2015).
- [37] Hassan, S. *et al.* Evolution and clinical translation of drug delivery nanomaterials. *Nano Today* **15**, 91–106 (2017).
- [38] Agrahari, V. y Agrahari, V. Facilitating the translation of nanomedicines to a clinical product: challenges and opportunities. *Drug Discovery Today* **23**, 974–991 (2018).
- [39] Caster, J., Patel, A., Zhang, T. y Wang, A. Investigational nanomedicines in 2016: a review of nanotherapeutics currently undergoing clinical trials. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* **9**, e1416; 1–18 (2016).
- [40] Martinho, N., Damgé, C. y Pinto-Reis, C. Recent advances in drug delivery systems. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology* **2**, 510–526 (2011).
- [41] Krauel, K., Pitaksuteepong, T., Davies, N. y Rades, T. Entrapment of bioactive molecules in poly (alkylcyanoacrylate) nanoparticles. *American Journal of Drug Delivery* **2**, 251–259 (2004).
- [42] Lipinski, C., Lombardo, F., Dominy, B. y Feeney, P. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews* **46**, 3–26 (2001).
- [43] Ravindran, S. *et al.* Pharmacokinetics, metabolism, distribution and permeability of nanomedicine. *Current Drug Metabolism* **19**, 327–334 (2018).
- [44] Cas, M. y Ghidoni, R. Dietary curcumin: Correlation between bioavailability and health potential. *Nutrients* **11**, 2147; 1–14 (2019).
- [45] Lipinski, C. Poor aqueous solubility—an industry wide problem in drug discovery. *American Pharmaceutical Review* **5**, 82–85 (2002).

- [46] Loftsson, T. y Brewster, M. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **62**, 1607–1621 (2010).
- [47] Chen, H., Khemtong, C., Yang, X., Chang, X. y Gao, J. Nanonization strategies for poorly water-soluble drugs. *Drug Discovery Today* **16**, 354–360 (2011).
- [48] Kalaydina, R., Bajwa, K., Qorri, B., DeCarlo, A. y Szewczuk, M. Recent advances in "smart" delivery systems for extended drug release in cancer therapy. *International Journal of Nanomedicine* **13**, 4727–4745 (2018).
- [49] Davoodi, P. *et al.* Drug delivery systems for programmed and on-demand release. *Advanced Drug Delivery Reviews* **132**, 104–138 (2018).
- [50] Rahoui, N., Jiang, B., Taloub, N. y Huang, Y. Spatio-temporal control strategy of drug delivery systems based nano structures. *Journal of Controlled Release* **255**, 176–201 (2017).
- [51] Kumar, R. In Mohapatra, S., Ranjan, S., Dasgupta, N., Mishra, R. y Thomas, S. (eds.) *Nanocarriers for Drug Delivery* (Elsevier, 2019).
- [52] Hoshyar, N., Gray, S., Han, H. y Bao, G. The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction. *Nanomedicine* **11**, 673–692 (2016).
- [53] Hashida, M. Role of pharmacokinetic consideration for the development of drug delivery systems: A historical overview. *Advanced Drug Delivery Reviews* **157**, 71–82 (2020).
- [54] Kumari, A., Yadav, S. y Yadav, S. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **75**, 1–18 (2010).
- [55] Almeida, A. y Souto, E. Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews* **59**, 478–490 (2007).
- [56] Huxford, R., Rocca, J. D. y Lin, W. Metal–organic frameworks as potential drug carriers. *Current Opinion in Chemical Biology* **14**, 262–268 (2010).
- [57] Rawat, M., Singh, D., Saraf, S. y Saraf, S. Nanocarriers: Promising vehicle for bioactive drugs. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **29**, 1790–1798 (2006).
- [58] Allen, T. y Cullis, P. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* **65**, 36–48 (2013).
- [59] Mehnert, W. Solid lipid nanoparticles production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* **47**, 165–196 (2001).
- [60] Rizwanullah, M., Ahmad, J. y Amin, S. Nanostructured lipid carriers: A novel platform for chemotherapeutics. *Current Drug Delivery* **13**, 4–26 (2016).
- [61] Tang, B., Cheng, G., Gu, J. y Xu, C. Development of solid self-emulsifying drug delivery systems: preparation techniques and dosage forms. *Drug Discovery Today* **13**, 606–612 (2008).

- [62] Kathe, N., Henriksen, B. y Chauhan, H. Physicochemical characterization techniques for solid lipid nanoparticles: Principles and limitations. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **40**, 1565–1575 (2014).
- [63] Joshi, M. y Müller, R. Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **71**, 161–172 (2009).
- [64] Jores, K., Mehnert, W. y Mäder, K. Physicochemical investigations on solid lipid nanoparticles and on oil-loaded solid lipid nanoparticles: A nuclear magnetic resonance and electron spin resonance study. *Pharmaceutical Research* **20**, 1274–1283 (2003).
- [65] Müller, R., Radtke, M. y Wissing, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Advanced Drug Delivery Reviews* **54**, 131–155 (2002).
- [66] Davis, M., Chen, Z. y Shin, D. Nanoparticle therapeutics: An emerging treatment modality for cancer. *Nature Reviews Drug Discovery* **7**, 771–782 (2008).
- [67] Müller, R., Radtke, M. y Wissing, S. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *International Journal of Pharmaceutics* **242**, 121–128 (2002).
- [68] Smith, A. y Hunneyball, I. Evaluation of poly(lactic acid) as a biodegradable drug delivery system for parenteral administration. *International Journal of Pharmaceutics* **30**, 215–220 (1986).
- [69] Harde, H., Das, M. y Jain, S. Solid lipid nanoparticles: An oral bioavailability enhancer vehicle. *Expert Opinion on Drug Delivery* **8**, 1407–1424 (2011).
- [70] Wissing, S., Kayser, O. y Müller, R. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **56**, 1257–1272 (2004).
- [71] Cavalli, R., Caputo, O. y Gasco, M. Solid lipospheres of doxorubicin and idarubicin. *International Journal of Pharmaceutics* **89**, 9–12 (1993).
- [72] Jennings, V. y Gohla, S. Comparison of wax and glyceride solid lipid nanoparticles (SLN®). *International Journal of Pharmaceutics* **196**, 219–222 (2000).
- [73] Bunjes, H., Koch, M. y Westesen, K. Effect of particle size on colloidal solid triglycerides. *Langmuir* **16**, 5234–5241 (2000).
- [74] Lippacher, A., Müller, R. y Mäder, K. Semisolid SLNTM dispersions for topical application: Influence of formulation and production parameters on viscoelastic properties. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **53**, 155–160 (2002).
- [75] Shah, S. *et al.* Fluorescence properties of doxorubicin in PBS buffer and PVA films. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **170**, 65–69 (2017).
- [76] Bunjes, H., Westesen, K. y Koch, M. Crystallization tendency and polymorphic transitions in triglyceride nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* **129**, 159–173 (1996).

- [77] Freitas, C. y Müller, R. Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN) and crystallinity of the lipid phase. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **47**, 125–132 (1999).
- [78] Hosseini, S., Zandi, M., Rezaei, M. y Farahmandghavi, F. Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro release study. *Carbohydrate Polymers* **95**, 50–56 (2013).
- [79] Hauss, D. Oral lipid-based formulations. *Advanced Drug Delivery Reviews* **59**, 667–676 (2007).
- [80] Attama, A. y Umeyor, C. The use of solid lipid nanoparticles for sustained drug release. *Therapeutic Delivery* **6**, 669–684 (2015).
- [81] Rostami, E., Kashanian, S. y Azandaryani, A. H. Preparation of solid lipid nanoparticles as drug carriers for levothyroxine sodium with in vitro drug delivery kinetic characterization. *Molecular Biology Reports* **41**, 3521–3527 (2014).
- [82] Souto, E., Wissing, S., Barbosa, C. y Müller, R. Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. *International Journal of Pharmaceutics* **278**, 71–77 (2004).
- [83] Westesen, K., Bunjes, H. y Koch, M. Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their drug loading capacity and sustained release potential. *Journal of Controlled Release* **48**, 223–236 (1997).
- [84] Souto, E., Almeida, A. y Müller, R. Lipid nanoparticles (SLN®, NLC®) for cutaneous drug delivery: Structure, protection and skin effects. *Journal of Biomedical Nanotechnology* **3**, 317–331 (2007).
- [85] Ganesan, P. y Narayanasamy, D. Lipid nanoparticles: Different preparation techniques, characterization, hurdles, and strategies for the production of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for oral drug delivery. *Sustainable Chemistry and Pharmacy* **6**, 37–56 (2017).
- [86] Garzón, M., Hernández, A., Vázquez, M., Villafuerte, L. y García, B. Preparación de nanopartículas sólidas lipídicas y de acarreadores lipídicos nanoestructurados. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* **39**, 50–66 (2008).
- [87] Manjunath, K., Ready, J. y Venkateswarlu., V. Solid lipid nanoparticles as drug delivery systems. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* **27**, 127–144 (2005).
- [88] Chivere, V., Kondiah, P., Choonara, Y. y Pillay, V. Nanotechnology-based biopolymeric oral delivery platforms for advanced cancer treatment. *Cancers* **12**, 522; 1–22 (2020).
- [89] Mu, H. y Holm, R. Solid lipid nanocarriers in drug delivery: characterization and design. *Expert Opinion on Drug Delivery* **15**, 771–785 (2018).
- [90] Kreuter, J. Drug targeting with nanoparticles. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* **19**, 253–256 (1994).

- [91] Böttger, R. *et al.* Lipid-based nanoparticle technologies for liver targeting. *Advanced Drug Delivery Reviews* **154-155**, 79–101 (2020).
- [92] Moghimi, S., Hunter, A. y Murray, J. Long-circulating and target-specific nanoparticles: Theory to practice. *Pharmacological Reviews* **53**, 283–318 (2001).
- [93] Vasir, J., Reddy, M. y Labhasetwar, V. Nanosystems in drug targeting: Opportunities and challenges. *Current Nanoscience* **1**, 47–64 (2005).
- [94] Xu, L., Bai, Q., Zhang, X. y Yang, H. Folate-mediated chemotherapy and diagnostics: An updated review and outlook. *Journal of Controlled Release* **252**, 73–82 (2017).
- [95] Alibakhshi, A. *et al.* Targeted cancer therapy through antibody fragments-decorated nanomedicines. *Journal of Controlled Release* **268**, 323–334 (2017).
- [96] Andrade, R., Reis, B., Costas, B., Costa-Lima, S. y Reis, S. Modulation of macrophages M1/M2 polarization using carbohydrate-functionalized polymeric nanoparticles. *Polymers* **13**, 88; 1–18 (2020).
- [97] Pandey, P. y Balekar, N. In Grumezescu, A. M. (ed.) *Drug Targeting and Stimuli Sensitive Drug Delivery Systems* (William Andrew Publishing, Elsevier, 2018).
- [98] Fernández, M., Javaid, F. y Chudasama, V. Advances in targeting the folate receptor in the treatment/imaging of cancers. *Chemical Science* **9**, 790–810 (2018).
- [99] Zwicke, G., Mansoori, G. y Jeffery, C. Utilizing the folate receptor for active targeting of cancer nanotherapeutics. *Nano Reviews* **3**, 18496; 1–11 (2012).
- [100] Sosnik, A. In Sarmento, B. y das Neves, J. (eds.) *Biomedical Applications of Functionalized Nanomaterials* (Elsevier, 2018).
- [101] Shibuya, M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor (VEGFR) signaling in angiogenesis: A crucial target for anti- and pro-angiogenic therapies. *Genes & Cancer* **2**, 1097–1105 (2011).
- [102] Mukherjee, A., Madamsetty, V., Paul, M. y Mukherjee, S. Recent advancements of nanomedicine towards antiangiogenic therapy in cancer. *International Journal of Molecular Sciences* **21**, 455; 1–31 (2020).
- [103] Chung, Y. H., Beiss, V., Fiering, S. y Steinmetz, N. COVID-19 vaccine frontrunners and their nanotechnology design. *ACS Nano* **14**, 12522–12537 (2020).
- [104] Shin, M. *et al.* COVID-19 vaccine development and a potential nanomaterial path forward. *Nature Nanotechnology* **15**, 646–655 (2020).
- [105] Jackson, L. *et al.* An mRNA vaccine against SARS-CoV-2 — preliminary report. *New England Journal of Medicine* **383**, 1920–1931 (2020).
- [106] Cai, S., Yang, Q., Bagby, T. y Forrest, M. Lymphatic drug delivery using engineered liposomes and solid lipid nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews* **63**, 901–908 (2011).
- [107] Park, K., Sun, X., Aikins, M. y Moon, J. Non-viral COVID-19 vaccine delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* **169**, 137–151 (2021).

- [108] Sarhadi, S., Ganjali, S., Pirro, M. y Sahebkar, A. The role of high-density lipoproteins in antitumor drug delivery. *IUBMB Life* **71**, 1442–1452 (2019).
- [109] Tapeinos, C., Battaglini, M. y Ciofani, G. Advances in the design of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for targeting brain diseases. *Journal of Controlled Release* **264**, 306–332 (2017).
- [110] Quijia-Quezada, C. *et al.* Advances in nanocarriers as drug delivery systems in chagas disease. *International Journal of Nanomedicine* **14**, 6407–6424 (2019).
- [111] Heidari-Kharaji, M. *et al.* Enhanced paromomycin efficacy by solid lipid nanoparticle formulation against Leishmania in mice model. *Parasite Immunology* **38**, 599–608 (2016).
- [112] Baldissera, M. *et al.* A nanotechnology based new approach for trypanosoma evansi chemotherapy: In vitro and vivo trypanocidal effect of (-)- α -bisabolol. *Experimental Parasitology* **170**, 156–160 (2016).
- [113] Gaspar, D. *et al.* Rifabutin-loaded solid lipid nanoparticles for inhaled anti-tubercular therapy: Physicochemical and in vitro studies. *International Journal of Pharmaceutics* **497**, 199–209 (2016).
- [114] Shazly, G. Ciprofloxacin controlled-solid lipid nanoparticles: Characterization, in vitro release, and antibacterial activity assessment. *BioMed Research International* **2017**, 1–9 (2017).
- [115] Gygli, S., Borrell, S., Trauner, A. y Gagneux, S. Antimicrobial resistance in mycobacterium tuberculosis: mechanistic and evolutionary perspectives. *FEMS Microbiology Reviews* **41**, 354–373 (2017).
- [116] Gaspar, D. *et al.* Microencapsulated solid lipid nanoparticles as a hybrid platform for pulmonary antibiotic delivery. *Molecular Pharmaceutics* **14**, 2977–2990 (2017).
- [117] Hu, L., Tang, X. y Cui, F. Solid lipid nanoparticles (SLNs) to improve oral bioavailability of poorly soluble drugs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **56**, 1527–1535 (2004).
- [118] Talegaonkar, S. y Bhattacharyya, A. Potential of lipid nanoparticles (SLNs and NLCs) in enhancing oral bioavailability of drugs with poor intestinal permeability. *AAPS PharmSciTech* **20**, 1–15 (2019).
- [119] Seyfoddin, A., Shaw, J. y Al-Kassas, R. Solid lipid nanoparticles for ocular drug delivery. *Drug Delivery* **17**, 467–489 (2010).
- [120] Battaglia, L. *et al.* Application of lipid nanoparticles to ocular drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery* **13**, 1743–1757 (2016).
- [121] Schäfer-Korting, M., Mehnert, W. y Korting, H. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. *Advanced Drug Delivery Reviews* **59**, 427–443 (2007).
- [122] Sharma, G., Thakur, K., Raza, K., Singh, B. y Katore, O. Nanostructured lipid carriers: A new paradigm in topical delivery for dermal and transdermal applications. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* **34**, 355–386 (2017).

- [123] Madni, A. *et al.* Novel nanoparticulate systems for lung cancer therapy: an updated review. *Journal of Drug Targeting* **25**, 499–512 (2017).
- [124] Liu, J. *et al.* Solid lipid nanoparticles for pulmonary delivery of insulin. *International Journal of Pharmaceutics* **356**, 333–344 (2008).
- [125] Din, F. *et al.* Irinotecan-encapsulated double-reverse thermosensitive nanocarrier system for rectal administration. *Drug Delivery* **24**, 502–510 (2017).
- [126] Bozzuto, G. y Molinari, A. Liposomes as nanomedical devices. *International Journal of Nanomedicine* **10**, 975–999 (2015).
- [127] Rivankar, S. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *Journal of Cancer Research and Therapeutics* **10**, 853–858 (2014).
- [128] Wang, Z., Ling, L., Du, Y., Yao, C. y Li, X. Reduction responsive liposomes based on paclitaxel-ss-lysophospholipid with high drug loading for intracellular delivery. *International Journal of Pharmaceutics* **564**, 244–255 (2019).
- [129] Taylor, T., Davidson, P., Bruce, B. y Weiss, J. Liposomal nanocapsules in food science and agriculture. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **45**, 587–605 (2005).
- [130] Metselaar, J. *et al.* A novel family of l-amino acid-based biodegradable polymer-lipid conjugates for the development of long-circulating liposomes with effective drug-targeting capacity. *Bioconjugate Chemistry* **14**, 1156–1164 (2003).
- [131] Robson, A. *et al.* Advantages and limitations of current imaging techniques for characterizing liposome morphology. *Frontiers in Pharmacology* **9**, 80; 1–8 (2018).
- [132] Sercombe, L. *et al.* Advances and challenges of liposome assisted drug delivery. *Frontiers in Pharmacology* **6**, 1–13 (2015).
- [133] Olusanya, T., Ahmad, R., Ibegbu, D., Smith, J. y Elkordy, A. Liposomal drug delivery systems and anticancer drugs. *Molecules* **23**, 1–17 (2018).
- [134] Tila, D., Ghasemi, S., Yazdani-Arazi, S. y Ghanbarzadeh, S. Functional liposomes in the cancer-targeted drug delivery. *Journal of Biomaterials Applications* **30**, 3–16 (2015).
- [135] Egbaria, K. y Weiner, N. Liposomes as a topical drug delivery system. *Advanced Drug Delivery Reviews* **5**, 287–300 (1990).
- [136] Bochot, A. y Fattal, E. Liposomes for intravitreal drug delivery: A state of the art. *Journal of Controlled Release* **161**, 628–634 (2012).
- [137] Salimi, A. Liposomes as a novel drug delivery system: fundamental and pharmaceutical application. *Asian Journal of Pharmaceutics* **12**, 31–41 (2018).
- [138] Maja, L., Željko, K. y Mateja, P. Sustainable technologies for liposome preparation. *The Journal of Supercritical Fluids* **165**, 104984; 1–17 (2020).
- [139] Cui, S. *et al.* Correlation of the cytotoxic effects of cationic lipids with their headgroups. *Toxicology Research* **7**, 473–479 (2018).

- [140] Colino, C., Lanao, J. y Gutierrez-Millan, C. Targeting of hepatic macrophages by therapeutic nanoparticles. *Frontiers in Immunology* **11**, 218; 1–17 (2020).
- [141] Toh, M. y Chiu, G. Liposomes as sterile preparations and limitations of sterilisation techniques in liposomal manufacturing. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* **8**, 88–95 (2013).
- [142] Patil, Y. y Jadhav, S. Novel methods for liposome preparation. *Chemistry and Physics of Lipids* **177**, 8–18 (2014).
- [143] Zamani, P., Momtazi-Borojeni, A., Nik, M., Oskuee, R. y Sahebkar, A. Nanoliposomes as the adjuvant delivery systems in cancer immunotherapy. *Journal of Cellular Physiology* **233**, 5189–5199 (2018).
- [144] Li, Y. *et al.* Small-sized polymeric micelles incorporating docetaxel suppress distant metastases in the clinically-relevant 4T1 mouse breast cancer model. *BMC Cancer* **14**, 329; 1–15 (2014).
- [145] Hussain, A. *et al.* Elastic liposomes as novel carriers: Recent advances in drug delivery. *International Journal of Nanomedicine* **12**, 5087–5108 (2017).
- [146] Monteiro, N., Martins, A., Reis, R. y Neves, N. Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine. *Journal of The Royal Society Interface* **11**, 20140459; 1–24 (2014).
- [147] Drescher, S. y Hoogevest, P. V. The phospholipid research center: Current research in phospholipids and their use in drug delivery. *Pharmaceutics* **12**, 1235; 1–36 (2020).
- [148] Bourquin, J. *et al.* Biodistribution, Clearance, and Long-Term Fate of Clinically Relevant Nanomaterials. *Advanced Materials* **30**, 1–31 (2018).
- [149] Merino, M., Zalba, S. y Garrido, M. Immunoliposomes in clinical oncology: State of the art and future perspectives. *Journal of Controlled Release* **275**, 162–176 (2018).
- [150] Yingchoncharoen, P., Kalinowski, D. y Richardson, D. Lipid-based drug delivery systems in cancer therapy: What is available and what is yet to come. *Pharmacological Reviews* **68**, 701–787 (2016).
- [151] Sinatra, S., Teter, B., Bowden, J., Houston, M. y Martinez-Gonzalez, M. The Saturated Fat, Cholesterol, and Statin Controversy A Commentary. *Journal of the American College of Nutrition* **33**, 79–88 (2014).
- [152] Maranhão, R., Vital, C., Tavoni, T. y Graziani, S. Clinical experience with drug delivery systems as tools to decrease the toxicity of anticancer chemotherapeutic agents. *Expert Opinion on Drug Delivery* **14**, 1217–1226 (2017).
- [153] Lu, Y. y Park, K. Polymeric micelles and alternative nanonized delivery vehicles for poorly soluble drugs. *International Journal of Pharmaceutics* **453**, 198–214 (2013).
- [154] Laouini, A. *et al.* Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. *Journal of Colloid Science and Biotechnology* **1**, 147–168 (2012).

- [155] Gomez-Hens, A. y Fernandez-Romero, J. Analytical methods for the control of liposomal delivery systems. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **25**, 167–178 (2006).
- [156] Akbarzadeh, A. *et al.* Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters* **8**, 102; 1–9 (2013).
- [157] Lasic, D. In Petralia, P. (ed.) *Liposomes in Gene Delivery* (CRC Press, 1997).
- [158] Maherani, B., Arab-Tehrany, E., Mozafari, M., Gaiani, C. y Linder, M. Liposomes: A Review of Manufacturing Techniques and Targeting Strategies. *Current Nanoscience* **7**, 436–452 (2011).
- [159] Chonn, A. y Cullis, P. Recent advances in liposomal drug-delivery systems. *Current Opinion in Biotechnology* **6**, 698–708 (1995).
- [160] Mayer, L., Bally, M., Hope, M. y Cullis, P. Techniques for encapsulating bioactive agents into liposomes. *Chemistry and Physics of Lipids* **40**, 333–345 (1986).
- [161] Parthasarathy, R., Sacks, P., Harris, D., Brock, H. y Mehta, K. Interaction of liposome-associated all-trans-retinoic acid with squamous carcinoma cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **34**, 527–534 (1994).
- [162] Mehta, K., Sadeghi, T., McQueen, T. y Lopez-Berestein, G. Liposome encapsulation circumvents the hepatic clearance mechanisms of all-trans-retinoic acid. *Leukemia Research* **18**, 587–596 (1994).
- [163] Guaglianone, P. *et al.* Phase I and pharmacologic study of liposomal daunorubicin (DaunoXome). *Investigational New Drugs* **12**, 103–110 (1994).
- [164] Schürmann, D., Dormann, A., Grünewald, T. y Ruf, B. Successful treatment of AIDS-related pulmonary Kaposi's sarcoma with liposomal daunorubicin. *European Respiratory Journal* **7**, 824–825 (1994).
- [165] Romberg, B., Hennink, W. y Storm, G. Sheddable coatings for long-circulating nanoparticles. *Pharmaceutical Research* **25**, 55–71 (2007).
- [166] Ahmed, K. *et al.* Liposome: composition, characterisation, preparation, and recent innovation in clinical applications. *Journal of Drug Targeting* **27**, 742–761 (2018).
- [167] Shirley, M. Amikacin liposome inhalation suspension: A review in mycobacterium avium complex lung disease. *Drugs* **79**, 555–562 (2019).
- [168] Carita, A., Eloy, J., Chorilli, M., Lee, R. y Ricci-Leonardi, G. Recent advances and perspectives in liposomes for cutaneous drug delivery. *Current Medicinal Chemistry* **25**, 606–635 (2018).
- [169] Matsumura, Y. y Maeda, H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer research* **46**, 6387–6392 (1986).
- [170] Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y. y Hori, K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: A review. *Journal of Controlled Release* **65**, 271–284 (2000).

- [171] Barenholz, Y. C. Doxil® — the first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *Journal of Controlled Release* **160**, 117–134 (2012).
- [172] Wicki, A., Witzigmann, D., Balasubramanian, V. y Huwyler, J. Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications. *Journal of Controlled Release* **200**, 138–157 (2015).
- [173] Adler-Moore, J., Gangneux, J. y Pappas, P. Comparison between liposomal formulations of amphotericin b. *Medical Mycology* **54**, 223–231 (2016).
- [174] Saleem, K., Khursheed, Z., Hano, C., Anjum, I. y Anjum, S. Applications of nanomaterials in leishmaniasis: A focus on recent advances and challenges. *Nanomaterials* **9**, 1749; 1–18 (2019).
- [175] Alves-Moreira, R. *et al.* Miltefosine increases lipid and protein dynamics in leishmania amazonensis membranes at concentrations similar to those needed for cytotoxicity activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **58**, 3021–3028 (2014).
- [176] Allison, A. y Gregoriadis, G. Liposomes as immunological adjuvants. *Nature* **252**, 252–252 (1974).
- [177] Alving, C., Beck, Z., Matyas, G. y Rao, M. Liposomal adjuvants for human vaccines. *Expert Opinion on Drug Delivery* **13**, 807–816 (2016).
- [178] Sahin, U. *et al.* An RNA vaccine drives immunity in checkpoint-inhibitor-treated melanoma. *Nature* **585**, 107–112 (2020).
- [179] Rello, J., Romana-Parisella, F. y Perez, A. Alternatives to antibiotics in an era of difficult-to-treat resistance: new insights. *Expert Review of Clinical Pharmacology* **12**, 635–642 (2019).
- [180] Saxena, V. Preparation and physical characterization of DNA-binding cationic liposomes. *Methods Molecular Biology* **1522**, 245–250 (2016).
- [181] Martínez-González, R., Estelrich, J. y Busquets, M. Liposomes loaded with hydrophobic iron oxide nanoparticles: Suitable T2 contrast agents for MRI. *International Journal of Molecular Sciences* **17**, 1209; 1–14 (2016).
- [182] Vovesná, A., Zhigunov, A., Balouch, M. y Zbytovská, J. Ceramide liposomes for skin barrier recovery: A novel formulation based on natural skin lipids. *International Journal of Pharmaceutics* **596**, 120264 (2021).
- [183] Rahman, S. A. *et al.* Tretinoin-loaded liposomal formulations: from lab to comparative clinical study in acne patients. *Drug Delivery* **23**, 1184–1193 (2015).
- [184] Khanniri, E. *et al.* Application of liposomes in some dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **56**, 484–493 (2015).
- [185] Hanahan, D. y Weinberg, R. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
- [186] Zimmer, C. Biología evolutiva del cáncer. *Investigación y Ciencia* **79**, 6–13 (2007).

- [187] Hida, K., Maishi, N., Torii, C. y Hida, Y. Tumor angiogenesis—characteristics of tumor endothelial cells. *International Journal of Clinical Oncology* **21**, 206–212 (2016).
- [188] Somarelli, J. *et al.* Molecular biology and evolution of cancer: From discovery to action. *Molecular Biology and Evolution* **37**, 320–326 (2019).
- [189] Gerlinger, M. *et al.* Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *New England Journal of Medicine* **366**, 883–892 (2012).
- [190] Ayla, S. y Karahüseyinogluc, S. Cancer stem cells, their microenvironment and anoikis. *Critical ReviewsTM in Oncogenesis* **24**, 27–34 (2019).
- [191] Fares, J., Fares, M., Khachfe, H., Salhab, H. y Fares, Y. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **5**, 28; 1–17 (2020).
- [192] Eckhardt, B., Francis, P., Parker, B. y Anderson, R. Strategies for the discovery and development of therapies for metastatic breast cancer. *Nature Reviews Drug Discovery* **11**, 479–497 (2012).
- [193] Owonikoko, T. *et al.* Current approaches to the treatment of metastatic brain tumours. *Nature Reviews Clinical Oncology* **11**, 203–222 (2014).
- [194] Suhail, Y. *et al.* Systems biology of cancer metastasis. *Cell Systems* **9**, 109–127 (2019).
- [195] Feng, S. y Chien, S. Chemotherapeutic engineering: Application and further development of chemical engineering principles for chemotherapy of cancer and other diseases. *Chemical Engineering Science* **58**, 4087–4114 (2003).
- [196] Wan, L., Pantel, K. y Kang, Y. Tumor metastasis: Moving new biological insights into the clinic. *Nature Medicine* **19**, 1450–1464 (2013).
- [197] Devulapally, R. *et al.* Polymer nanoparticles mediated codelivery of AntimiR-10b and AntimiR-21 for achieving triple negative breast cancer therapy. *ACS Nano* **9**, 2290–2302 (2015).
- [198] Sartor, O. y de Bono, J. S. Metastatic prostate cancer. *New England Journal of Medicine* **378**, 645–657 (2018).
- [199] Achrol, A. *et al.* Brain metastases. *Nature Reviews Disease Primers* **5**, 5 (1–26) (2019).
- [200] Adams, G. y Weiner, L. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nature Biotechnology* **23**, 1147–1157 (2005).
- [201] Esteva, F. J., Hubbard-Lucey, V. M., Tang, J. y Pusztai, L. Immunotherapy and targeted therapy combinations in metastatic breast cancer. *The Lancet Oncology* **20**, e175–e186 (2019).
- [202] Chau, C. H., Steeg, P. S. y Figg, W. D. Antibody–drug conjugates for cancer. *The Lancet* **394**, 793–804 (2019).

- [203] He, Q. y Shi, J. MSN anti-cancer nanomedicines: Chemotherapy enhancement, overcoming of drug resistance, and metastasis inhibition. *Advanced Materials* **26**, 391–411 (2013).
- [204] Mandalà, M. y Voit, C. Targeting BRAF in melanoma: Biological and clinical challenges. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **87**, 239–255 (2013).
- [205] Domingues, B., Lopes, J., Soares, P. y Populo, H. Melanoma treatment in review. *ImmunoTargets and Therapy* **7**, 35–49 (2018).
- [206] Mishra, H. *et al.* Melanoma treatment: from conventional to nanotechnology. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* **144**, 2283–2302 (2018).
- [207] Helmbach, H., Rossmann, E., Kern, M. y Schadendorf, D. Drug-resistance in human melanoma. *International Journal of Cancer* **93**, 617–622 (2001).
- [208] Franco, S. D., Turdo, A., Todaro, M. y Stassi, G. Role of type I and II interferons in colorectal cancer and melanoma. *Frontiers in Immunology* **8**, 1–13 (2017).
- [209] Chen, J., Shao, R., Zhang, X. y Chen, C. Applications of nanotechnology for melanoma treatment, diagnosis, and theranostics. *International Journal of Nanomedicine* **8**, 2677–2688 (2013).
- [210] Menzies, A. y Long, G. Systemic treatment for BRAF-mutant melanoma: where do we go next? *The Lancet Oncology* **15**, e371–e381 (2014).
- [211] Sobhani, Z., Behnam, M., Emami, F., Dehghanian, A. y Jamhiri, I. Photothermal therapy of melanoma tumor using multiwalled carbon nanotubes. *International Journal of Nanomedicine* **12**, 4509–4517 (2017).
- [212] Mukhopadhyay, R., Kazi, J. y Debnath, M. Synthesis and characterization of copper nanoparticles stabilized with *Quisqualis indica* extract: Evaluation of its cytotoxicity and apoptosis in B16F10 melanoma cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **97**, 1373–1385 (2018).
- [213] Zhang, X., Teodoro, J. y Nadeau, J. Intratumoral gold-doxorubicin is effective in treating melanoma in mice. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **11**, 1365–1375 (2015).
- [214] Calderon-Gonzalez, R. *et al.* Gold glyconanoparticles coupled to listeriolysin O 91–99 peptide serve as adjuvant therapy against melanoma. *Nanoscale* **9**, 10721–10732 (2017).
- [215] Monge-Fuentes, V. *et al.* Photodynamic therapy mediated by acai oil (*Euterpe oleracea* Martius) in nanoemulsion: A potential treatment for melanoma. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **166**, 301–310 (2017).
- [216] Tupal, A., Sabzichi, M., Ramezani, F., Kouhsoltani, M. y Hamishehkar, H. Dermal delivery of doxorubicin-loaded solid lipid nanoparticles for the treatment of skin cancer. *Journal of Microencapsulation* **33**, 372–380 (2016).
- [217] Deng, C. *et al.* Coadministration of oligomeric hyaluronic acid-modified liposomes with tumor-penetrating peptide-iRGD enhances the antitumor efficacy of doxorubicin against melanoma. *ACS Applied Materials & Interfaces* **9**, 1280–1292 (2017).

- [218] Hirsch, F. R. *et al.* Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. *The Lancet* **389**, 299–311 (2017).
- [219] Schroeder, A. *et al.* Treating metastatic cancer with nanotechnology. *Nature Reviews Cancer* **12**, 39–50 (2012).
- [220] Stacker, S., Achen, M., Jussila, L., Baldwin, M. y Alitalo, K. Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nature Reviews Cancer* **2**, 573–583 (2002).
- [221] Tjan-Heijnen, V. y Viale, G. The lymph node and the metastasis. *New England Journal of Medicine* **378**, 2045–2046 (2018).
- [222] Cabral, H. *et al.* Systemic targeting of lymph node metastasis through the blood vascular system by using size-controlled nanocarriers. *ACS Nano* **9**, 4957–4967 (2015).
- [223] Chida, T. *et al.* Epirubicin-loaded polymeric micelles effectively treat axillary lymph nodes metastasis of breast cancer through selective accumulation and pH-triggered drug release. *Journal of Controlled Release* **292**, 130–140 (2018).
- [224] Mendoza, A. E.-H. D. *et al.* Complete inhibition of extranodal dissemination of lymphoma by edelfosine-loaded lipid nanoparticles. *Nanomedicine* **7**, 679–690 (2012).
- [225] Liu, R. *et al.* Prevention of nodal metastases in breast cancer following the lymphatic migration of paclitaxel-loaded expansile nanoparticles. *Biomaterials* **34**, 1810–1819 (2013).
- [226] Obinu, A. *et al.* Lymph node metastases: importance of detection and treatment strategies. *Expert Opinion on Drug Delivery* **15**, 459–467 (2018).
- [227] Wauthoz, N. *et al.* Safe lipid nanocapsule-based gel technology to target lymph nodes and combat mediastinal metastases from an orthotopic non-small-cell lung cancer model in SCID-CB17 mice. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* **11**, 1237–1245 (2015).
- [228] Ryan, G., Kaminskas, L. y Porter, C. Nano-chemotherapeutics: Maximising lymphatic drug exposure to improve the treatment of lymph-metastatic cancers. *Journal of Controlled Release* **193**, 241–256 (2014).
- [229] Kaur, C., Nahar, M. y Jain, N. Lymphatic targeting of zidovudine using surface-engineered liposomes. *Journal of Drug Targeting* **16**, 798–805 (2008).
- [230] Moghimi, S. y Kissel, T. Particulate nanomedicines. *Advanced Drug Delivery Reviews* **58**, 1451–1455 (2006).
- [231] Kaminskas, L. *et al.* Pulmonary administration of a doxorubicin-conjugated dendrimer enhances drug exposure to lung metastases and improves cancer therapy. *Journal of Controlled Release* **183**, 18–26 (2014).
- [232] Borrajo, E. *et al.* Docetaxel-loaded polyglutamic acid-PEG nanocapsules for the treatment of metastatic cancer. *Journal of Controlled Release* **238**, 263–271 (2016).

- [233] Wang, F. *et al.* Synergistic effect of folate-mediated targeting and verapamil-mediated P-gp inhibition with paclitaxel -polymer micelles to overcome multi-drug resistance. *Biomaterials* **32**, 9444–9456 (2011).
- [234] Lee, M., Lim, S. y Kim, C. Preparation, characterization and in vitro cytotoxicity of paclitaxel-loaded sterically stabilized solid lipid nanoparticles. *Biomaterials* **28**, 2137–2146 (2007).
- [235] Dong, X. *et al.* Development of new lipid-based paclitaxel nanoparticles using sequential simplex optimization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **72**, 9–17 (2009).
- [236] Bedikian, A. *et al.* Phase 3 study of docosahexaenoic acid-paclitaxel versus dacarbazine in patients with metastatic malignant melanoma. *Annals of Oncology* **22**, 787–793 (2011).
- [237] Kundranda, M. y Niu, J. Albumin-bound paclitaxel in solid tumors: clinical development and future directions. *Drug Design, Development and Therapy* **9**, 3767–3777 (2015).
- [238] Baldwin, E. y Osheroff, N. Etoposide, topoisomerase II and cancer. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents* **5**, 363–372 (2005).
- [239] Athawale, R., Jain, D., Singh, K. y Gude, R. Etoposide loaded solid lipid nanoparticles for curtailing B16F10 melanoma colonization in lung. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **68**, 231–240 (2014).
- [240] Evison, B., Sleebs, B., Watson, K., Phillips, D. y Cutts, S. Mitoxantrone, more than just another topoisomerase II poison. *Medicinal Research Reviews* **36**, 248–299 (2015).
- [241] Lu, B., Xiong, S., Yang, H., Yin, X. y Chao, R. Solid lipid nanoparticles of mitoxantrone for local injection against breast cancer and its lymph node metastases. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **28**, 86–95 (2006).
- [242] Amerigos-Daddy, J. *et al.* Co-encapsulation of mitoxantrone and β -elemene in solid lipid nanoparticles to overcome multidrug resistance in leukemia. *Pharmaceutics* **12**, 191; 1–19 (2020).
- [243] O’Neil, B. y Goldberg, R. Innovations in Chemotherapy for Metastatic Colorectal Cancer: An Update of Recent Clinical Trials. *The Oncologist* **13**, 1074–1083 (2008).
- [244] Kobayashi, H., Tan, E. y Fleming, S. Sodium Butyrate Inhibits Cell Growth and Stimulates p21 WAF1/CIP1 Protein in Human Colonic Adenocarcinoma Cells Independently of p53 Status. *Nutrition and Cancer* **46**, 202–211 (2003).
- [245] Brioschi, A., Zara, G., Calderoni, S., Gasco, M. y Mauro, A. Cholesterylbutyrate solid lipid nanoparticles as a butyric acid prodrug. *Molecules* **13**, 230–254 (2008).
- [246] Minucci, S. y Pelicci, P. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nature Reviews Cancer* **6**, 38–51 (2006).
- [247] Wang, W. *et al.* Sodium butyrate selectively kills cancer cells and inhibits migration in colorectal cancer by targeting thioredoxin-1. *OncoTargets and Therapy* **13**, 4691–4704 (2020).

- [248] Matsumura, Y. y Kataoka, K. Preclinical and clinical studies of anticancer agent-incorporating polymer micelles. *Cancer Science* **100**, 572–579 (2009).
- [249] Serpe, L. *et al.* Cholesteryl butyrate solid lipid nanoparticles as a butyric acid pro-drug: Effects on cell proliferation, cell-cycle distribution and c-myc expression in human leukemic cells. *Anti-Cancer Drugs* **15**, 525–536 (2004).
- [250] Khaledi, H. *et al.* Antioxidant, cytotoxic activities, and structure-activity relationship of gallic acid-based indole derivatives. *Archiv der Pharmazie* **344**, 703–709 (2011).
- [251] Jagan, S., Ramakrishnan, G., Anandakumar, P., Kamaraj, S. y Devaki, T. Antiproliferative potential of gallic acid against diethylnitrosamine-induced rat hepatocellular carcinoma. *Molecular and Cellular Biochemistry* **319**, 51–59 (2008).
- [252] Bernhaus, A. *et al.* Digalloylresveratrol, a new phenolic acid derivative induces apoptosis and cell cycle arrest in human HT-29 colon cancer cells. *Cancer Letters* **274**, 299–304 (2009).
- [253] Subramanian, A., Jaganathan, S., Mandal, M., Supriyanto, E. y Muhamad, I. Gallic acid induced apoptotic events in HCT-15 colon cancer cells. *World Journal of Gastroenterology* **22**, 3952–3961 (2016).
- [254] Locatelli, C. *et al.* Antimetastatic activity and low systemic toxicity of tetradecyl gallate in a preclinical melanoma mouse model. *Investigational New Drugs* **30**, 870–879 (2012).
- [255] Cordova, C. *et al.* Solid lipid nanoparticles improve octyl gallate antimetastatic activity and ameliorate its renal and hepatic toxic effects. *Anti-Cancer Drugs* **28**, 977–988 (2017).
- [256] Gudkov, A. *et al.* Isolation of genetic suppressor elements, inducing resistance to topoisomerase II-interactive cytotoxic drugs, from human topoisomerase II cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 3231–3235 (1993).
- [257] Martins-Teixeira, M. y Carvalho, I. Antitumour anthracyclines: Progress and perspectives. *ChemMedChem* **15**, 933–948 (2020).
- [258] Müller, I., Niethammer, D. y Bruchelt, G. Anthracycline-derived chemotherapeutics in apoptosis and free radical cytotoxicity (Review). *International journal of molecular medicine* **1**, 491–494 (1998).
- [259] Cappetta, D. *et al.* Oxidative stress and cellular response to doxorubicin: A common factor in the complex milieu of anthracycline cardiotoxicity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2017**, 1–13 (2017).
- [260] Fabiani, I. *et al.* Oxidative stress and inflammation: determinants of anthracycline cardiotoxicity and possible therapeutic targets. *Heart Failure Reviews* 1–10 (2020).
- [261] Licata, S., Saponiero, A., Mordente, A. y Minotti, G. Doxorubicin metabolism and toxicity in human myocardium: Role of cytoplasmic deglycosidation and carbonyl reduction. *Chemical Research in Toxicology* **13**, 414–420 (2000).

- [262] Schaupp, C. M., White, C. C., Merrill, G. F. y Kavanagh, T. J. Metabolism of doxorubicin to the cardiotoxic metabolite doxorubicinol is increased in a mouse model of chronic glutathione deficiency: A potential role for carbonyl reductase 3. *Chemico-Biological Interactions* **234**, 154–161 (2015).
- [263] Zeng, X. *et al.* Pharmacokinetics and cardiotoxicity of doxorubicin and its secondary alcohol metabolite in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **116**, 108964; 1–9 (2019).
- [264] Boucek, R. *et al.* The major metabolite of doxorubicin is a potent inhibitor of membrane-associated ion pumps: A correlative study of cardiac muscle with isolated membrane fractions. *Journal of Biological Chemistry* **262**, 15851–15856 (1987).
- [265] Zhao, L. y Zhang, B. Doxorubicin induces cardiotoxicity through upregulation of death receptors mediated apoptosis in cardiomyocytes. *Scientific Reports* **7**, 44735; 1–11 (2017).
- [266] Cattel, L., Ceruti, M. y Dosio, F. From conventional to stealth liposomes: A new frontier in cancer chemotherapy. *Journal of Chemotherapy* **16**, 94–97 (2004).
- [267] Tardi, C., Drechsler, M., Bauer, K. y Brandl, M. Steam sterilisation of vesicular phospholipid gels. *International Journal of Pharmaceutics* **217**, 161–172 (2001).
- [268] Moos, R. V. *et al.* Pegylated liposomal doxorubicin-associated hand-foot syndrome: Recommendations of an international panel of experts. *European Journal of Cancer* **44**, 781–790 (2008).
- [269] Waterhouse, D., Tardi, P., Mayer, L. y Bally, M. A comparison of liposomal formulations of doxorubicin with Drug Administered in free form: Changing toxicity profiles. *Drug Safety* **24**, 903–920 (2001).
- [270] Adamo, V. *et al.* Pegylated liposomal doxorubicin and gemcitabine in the front-line treatment of recurrent/metastatic breast cancer: a multicentre phase II study. *British Journal of Cancer* **98**, 1916–1921 (2008).
- [271] Bromberg, L. Polymeric micelles in oral chemotherapy. *Journal of Controlled Release* **128**, 99–112 (2008).
- [272] Pillai, G. y Ceballos-Coronel, M. Science and technology of the emerging nanomedicines in cancer therapy: A primer for physicians and pharmacists. *SAGE Open Medicine* **1**, 205031211351375; 1–17 (2013).
- [273] Stella, B. *et al.* Development and characterization of solid lipid nanoparticles loaded with a highly active doxorubicin derivative. *Nanomaterials* **8**, 1–16 (2018).
- [274] Lorusso, D. *et al.* Pegylated liposomal doxorubicin-related palmar-plantar erythrodysesthesia ('hand-foot' syndrome). *Annals of Oncology* **18**, 1159–1164 (2007).
- [275] Mussi, S. *et al.* New approach to improve encapsulation and antitumor activity of doxorubicin loaded in solid lipid nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **48**, 282–290 (2013).
- [276] Subedi, R., Kang, K. y Choi, H. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles loaded with doxorubicin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **37**, 508–513 (2009).

- [277] Gong, T. *et al.* Lipid nanoemulsions loaded with doxorubicin-oleic acid ionic complex: characterization, in vitro and in vivo studies. *Pharmazie* **66**, 496–505 (2011).
- [278] Cao, X. *et al.* Coencapsulated doxorubicin and bromotetrandrine lipid nanoemulsions in reversing multidrug resistance in breast cancer in vitro and in vivo. *Molecular Pharmaceutics* **12**, 274–286 (2014).
- [279] Du, Y. *et al.* Preparation and characteristics of lipid nanoemulsion formulations loaded with doxorubicin. *International Journal of Nanomedicine* **8**, 3141–3150 (2013).
- [280] Zara, G. *et al.* Pharmacokinetics of doxorubicin incorporated in solid lipid nanospheres (SLN). *Pharmacological Research* **40**, 281–286 (1999).
- [281] Miglietta, A., Cavalli, R., Bocca, C., Gabriel, L. y Gasco, M. Cellular uptake and cytotoxicity of solid lipid nanospheres (SLN) incorporating doxorubicin or paclitaxel. *International Journal of Pharmaceutics* **210**, 61–67 (2000).
- [282] Wong, H., Bendayan, R., Rauth, A. y Wu, X. Simultaneous delivery of doxorubicin and GG918 (elacridar) by new polymer-lipid hybrid nanoparticles (PLN) for enhanced treatment of multidrug-resistant breast cancer. *Journal of Controlled Release* **116**, 275–284 (2006).
- [283] Wong, H., Rauth, A., Bendayan, R. y Wu, X. In vivo evaluation of a new polymer-lipid hybrid nanoparticle (PLN) formulation of doxorubicin in a murine solid tumor model. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **65**, 300–308 (2007).
- [284] Casciaro, R. *et al.* Role of nebulized amphotericin b in the management of allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis: Case report and review of literature. *Journal of Chemotherapy* **27**, 307–311 (2014).
- [285] Santos-Ramos, M. D. *et al.* Nanotechnology-based drug delivery systems for control of microbial biofilms: a review. *International Journal of Nanomedicine* **13**, 1179–1213 (2018).
- [286] Eleraky, N., Allam, A., Hassan, S. y Omar, M. Nanomedicine fight against antibacterial resistance: An overview of the recent pharmaceutical innovations. *Pharmaceutics* **14**, 1–49 (2020).
- [287] Cohen, M. Changing patterns of infectious disease. *Nature* **406**, 762–767 (2000).
- [288] Harbarth, S. *et al.* Antibiotic research and development: business as usual? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **70**, 1604–1607 (2015).
- [289] Kirby, T. New antimicrobials—lots of talk, where is the action? *The Lancet Infectious Diseases* **16**, 411–412 (2016).
- [290] Fernandes, P. y Martens, E. Antibiotics in late clinical development. *Biochemical Pharmacology* **133**, 152–163 (2017).
- [291] Andrei, S., Droc, G. y Stefan, G. FDA approved antibacterial drugs: 2018-2019. *Discoveries* **7**, e102; 1–11 (2019).

- [292] Ladavière, C. y Gref, R. Toward an optimized treatment of intracellular bacterial infections: Input of nanoparticulate drug delivery systems. *Nanomedicine* **10**, 3033–3055 (2015).
- [293] Santajit, S. y Indrawattana, N. Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *BioMed Research International* **2016**, 1–8 (2016).
- [294] Mulani, M., Kamble, E., Kumkar, S., Tawre, M. y Pardesi, K. Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: A review. *Frontiers in Microbiology* **10**, 539; 1–24 (2019).
- [295] Navidinia, M. The clinical importance of emerging escape pathogens in nosocomial infections. *Journal of Paramedical Sciences* **7**, 2008–4978 (2016).
- [296] Tacconelli, E. *et al.* Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases* **18**, 318–327 (2018).
- [297] Kaur, I. Novel strategies to combat antimicrobial resistance. *Journal of Infectious Diseases & Therapy* **4**, 292; 1–6 (2016).
- [298] Jiang, L., Lin, J., Taggart, C., Bengoechea, J. y Scott, C. Nanodelivery strategies for the treatment of multidrug-resistant bacterial infections. *Journal of Interdisciplinary Nanomedicine* **3**, 111–121 (2018).
- [299] Pelgrift, R. y Friedman, A. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Advanced Drug Delivery Reviews* **65**, 1803–1815 (2013).
- [300] Miotto, P., Zhang, Y., Cirillo, D. y Yam, W. Drug resistance mechanisms and drug susceptibility testing for tuberculosis. *Respirology* **23**, 1098–1113 (2018).
- [301] Huh, A. y Kwon, Y. “Nanoantibiotics”: A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *Journal of Controlled Release* **156**, 128–145 (2011).
- [302] Briones, E., Colino, C. y Lanao, J. Delivery systems to increase the selectivity of antibiotics in phagocytic cells. *Journal of Controlled Release* **125**, 210–227 (2008).
- [303] Gao, Z., Yang, D., Wan, Y. y Yang, Y. One-step synthesis of carbon dots for selective bacterial inactivation and bacterial differentiation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **412**, 871–880 (2020).
- [304] Dong, Y., Zhu, H., Shen, Y., Zhang, W. y Zhang, L. Antibacterial activity of silver nanoparticles of different particle size against vibrio natriegens. *PLOS ONE* **14**, e0222322; 1–12 (2019).
- [305] Dilnawaz, F., Acharya, S. y Sahoo, S. Recent trends of nanomedicinal approaches in clinics. *International Journal of Pharmaceutics* **538**, 263–278 (2018).
- [306] Gao, W., Thamphiwatana, S., Angsantikul, P. y Zhang, L. Nanoparticle approaches against bacterial infections. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* **6**, 532–547 (2014).

- [307] Imbuluzqueta, E., Gamazo, C. y J. Ariza, M. B.-P. Drug delivery systems for potential treatment of intracellular bacterial infections. *Frontiers in Bioscience* **15**, 397–417 (2010).
- [308] Page-Clisson, M., Pinto-Alphandary, H., Chachaty, E., Couvreur, P. y Andremont, A. Drug targeting by polyalkylcyanoacrylate nanoparticles is not efficient against persistent salmonella. *Pharmaceutical Research* **15**, 544–549 (1998).
- [309] Subramaniam, S. *et al.* Rifampicin-loaded mesoporous silica nanoparticles for the treatment of intracellular infections. *Antibiotics* **8**, 39; 1–15 (2019).
- [310] Deng, H. *et al.* Mechanistic study of the synergistic antibacterial activity of combined silver nanoparticles and common antibiotics. *Environmental Science & Technology* **50**, 8840–8848 (2016).
- [311] Magallanes, M., Dijkstra, J. y Fierer, J. Liposome-incorporated ciprofloxacin in treatment of murine salmonellosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **37**, 2293–2297 (1993).
- [312] Trinetta, V., Morgan, M., Coupland, J. y Yucel, U. Essential oils against pathogen and spoilage microorganisms of fruit juices: Use of versatile antimicrobial delivery systems. *Journal of Food Science* **82**, 471–476 (2017).
- [313] Balbi, H. Chloramphenicol: A review. *Pediatrics in Review* **25**, 284–288 (2004).
- [314] Hansen, J., Moore, P. y Steitz, T. Structures of five antibiotics bound at the peptidyl transferase center of the large ribosomal subunit. *Journal of Molecular Biology* **330**, 1061–1075 (2003).
- [315] Abdollahi, M. y Mostafalou, S. In Wexler, P. (ed.) *Encyclopedia of Toxicology* (Academic Press, Oxford, 2014).
- [316] Wiest, D., Cochran, J. y Tecklenburg, F. Chloramphenicol toxicity revisited: A 12-year-old patient with a brain abscess. *The Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics* **17**, 182–188 (2012).
- [317] Dias-Souza, M., Soares, D. y dos Santos, V. Comparative study of free and liposome-entrapped chloramphenicol against biofilms of potentially pathogenic bacteria isolated from cooling towers. *Saudi Pharmaceutical Journal* **25**, 999–1004 (2017).
- [318] Katva, S., Das, S., Moti, H., Jyoti, A. y Kaushik, S. Antibacterial synergy of silver nanoparticles with gentamicin and chloramphenicol against enterococcus faecalis. *Pharmacognosy magazine* **13**, S828–S833 (2017).
- [319] Albayati, T., Salih, I. y Alazzawi, H. Synthesis and characterization of a modified surface of SBA-15 mesoporous silica for a chloramphenicol drug delivery system. *Heliyon* **5**, e02539; 1–7 (2019).
- [320] Gellert, M., Mizuuchi, K., O’Dea, M., Itoh, T. y Tomizawa, J. Nalidixic acid resistance: A second genetic character involved in DNA gyrase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 4772–4776 (1977).

- [321] Dalhoff, A. Antiviral, antifungal, and antiparasitic activities of fluoroquinolones optimized for treatment of bacterial infections: a puzzling paradox or a logical consequence of their mode of action? *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **34**, 661–668 (2015).
- [322] Senerovic, L. *et al.* Quinolines and quinolones as antibacterial, antifungal, anti-virulence, antiviral and anti-parasitic agents. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. **1282**, 37–69 (2020).
- [323] Dautrey, S. *et al.* Active intestinal elimination of ciprofloxacin in rats: Modulation by different substrates. *British Journal of Pharmacology* **127**, 1728–1734 (1999).
- [324] Rabbaa, L., Dautrey, S., Colas-Linhart, N., Carbon, C. y Farinotti, R. Absorption of ofloxacin isomers in the rat small intestine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41**, 2274–2277 (1997).
- [325] Zhanel, G. Influence of pharmacokinetic and pharmacodynamic principles on antibiotic selection. *Current Infectious Disease Reports* **3**, 29–34 (2001).
- [326] Bax, B. *et al.* The twinned 3.35 Å structure of *S. aureus* gyrase complex with ciprofloxacin and DNA. *Nature* **466**, 935–940 (2010).
- [327] Bertino, J. y Fish, D. The safety profile of the fluoroquinolones. *Clinical Therapeutics* **22**, 798–817 (2000).
- [328] Yoshida, H., Kojima, T., Yamagishi, J. y Nakamura, S. Quinolone-resistant mutations of the *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics MGG* **211**, 1–7 (1988).
- [329] Everett, M., Jin, Y., Ricci, V. y Piddock, L. Contributions of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli* strains isolated from humans and animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40**, 2380–2386 (1996).
- [330] Poole, K. Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**, 2233–2241 (2000).
- [331] Fleckenstein, E., Uphoff, C. y Drexler, H. Effective treatment of mycoplasma contamination in cell lines with enrofloxacin (baytril). *Leukemia* **8**, 1424–1434 (1994).
- [332] Uphoff, C., Denkmann, S. y Drexler, H. Treatment of mycoplasma contamination in cell cultures with plasmocin. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2012**, 1–8 (2012).
- [333] Xie, S. *et al.* Enhanced intracellular delivery and antibacterial efficacy of enrofloxacin-loaded docosanoic acid solid lipid nanoparticles against intracellular salmonella. *Scientific Reports* **7**, 41104; 1–9 (2017).
- [334] Meng, K. *et al.* Intracellular delivery, accumulation, and discrepancy in antibacterial activity of four enrofloxacin-loaded fatty acid solid lipid nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **194**, 111196; 1–26 (2020).
- [335] Dilbaghi, N., Kaur, H., Ahuja, M. y Kumar, S. Preparation and evaluation of enrofloxacin-loaded solid lipid nanoparticles. *Journal of Nanoengineering and Nanomanufacturing* **3**, 147–153 (2013).

- [336] Deim, Z., Deim, T., Bas, L. y Elmas, M. The use of liposomal enrofloxacin for intracellular infections in kangal dogs and visualization of phagocytosis of liposomes. *Journal of Biomedical Materials Research* **61**, 246–251 (2002).
- [337] Bas, A. *et al.* Determination of intracellular concentrations of free and two types of liposome-encapsulated enrofloxacin in anatolian shepherd dog monocytes. *Journal of Veterinary Medicine Series B* **49**, 289–293 (2002).
- [338] Jadhav, N. *et al.* Synthesis of oleic acid functionalized Fe₃O₄ magnetic nanoparticles and studying their interaction with tumor cells for potential hyperthermia applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **108**, 158–168 (2013).
- [339] Moura, C. *et al.* Magnetic hybrid wax nanocomposites as externally controlled theranostic vehicles: High MRI enhancement and synergistic magnetically assisted thermo/chemo therapy. *Chemistry – A European Journal* **26**, 4531–4538 (2020).
- [340] Szoka, F. y Papahadjopoulos, D. Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). *Annual Review of Biophysics and Bioengineering* **9**, 467–508 (1980).
- [341] Zhang, H. In D'Souza, G. (ed.) *Liposomes. Methods in Molecular Biology* (Humana Press, New York, NY, 2016).
- [342] Williams, P. In Drioli, E. y Giorno, L. (eds.) *Encyclopedia of Membranes* (Springer, Berlin, Heidelberg, 2016).
- [343] Almeida, R. D. *et al.* Preliminary evaluation of novel triglyceride-based nanocomposites for biomedical applications. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **1**, 1–10 (2017).
- [344] Korsmeyer, R., Gurny, R., Doelker, E., Buri, P. y Peppas, N. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International Journal of Pharmaceutics* **15**, 25–35 (1983).
- [345] Müller, K. *et al.* pH-dependent toxicity of high aspect ratio ZnO nanowires in macrophages due to intracellular dissolution. *ACS Nano* **4**, 6767–6779 (2010).
- [346] Higuchi, T. Mechanism of sustained-action medication. theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **52**, 1145–1149 (1963).
- [347] Ritger, P. y Peppas, N. A simple equation for description of solute release I. fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *Journal of Controlled Release* **5**, 23–36 (1987).
- [348] Mircioiu, C. *et al.* Mathematical modeling of release kinetics from supramolecular drug delivery systems. *Pharmaceutics* **11**, 140; 1–45 (2019).
- [349] Vincent, W., Freisinger, C., Lam, P., Huttenlocher, A. y Sauer, J. Macrophages mediate flagellin induced inflammasome activation and host defense in zebrafish. *Cellular Microbiology* **18**, 591–604 (2015).
- [350] Bécavin, C. *et al.* Comparison of widely used *Listeria monocytogenes* strains EGD, 10403s, and EGD-e highlights genomic differences underlying variations in pathogenicity. *American Society for Microbiology* **5**, e00969; 1–12 (2014).

- [351] Cheng, M., Chen, C., Engström, P., Portnoy, D. y Mitchell, G. Actin-based motility allows *Listeria monocytogenes* to avoid autophagy in the macrophage cytosol. *Cellular Microbiology* **20**, e12854; 1–13 (2018).
- [352] Fidler, I. Selection of successive tumour lines for metastasis. *Nature New Biology* **242**, 148–149 (1973).
- [353] Poste, G., Doll, J., Hart, I. y Fidler, I. In vitro selection of murine B16 melanoma variants with enhanced tissue-invasive properties. *Cancer Research* **40**, 1636–1644 (1980).
- [354] Overwijk, W. y Restifo, N. B16 as a mouse model for human melanoma. *Current Protocols in Immunology* **39**, 1–29 (2000).
- [355] Weiser, J. y Saltzman, W. Controlled release for local delivery of drugs: barriers and models. *Journal of Controlled Release* **190**, 664–673 (2014).
- [356] Mitragotri, S., Burke, P. y Langer, R. Overcoming the challenges in administering biopharmaceuticals: formulation and delivery strategies. *Nature Reviews Drug Discovery* **13**, 655–672 (2014).
- [357] Mellema, M., Benthum, W. V., Boer, B., Harras, J. V. y Visser, A. Wax encapsulation of water-soluble compounds for application in foods. *Journal of Microencapsulation* **23**, 729–740 (2006).
- [358] Laird, T. Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry, 5th. *Organic Process Research & Development* **1**, 391–392 (1997).
- [359] de Freitas, C. S. *et al.* Carnauba wax uses in food – a review. *Food Chemistry* **291**, 38–48 (2019).
- [360] Özyazıcı, M., Gökçe, E. y Ertan, G. Release and diffusional modeling of metronidazole lipid matrices. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **63**, 331–339 (2006).
- [361] Savolainen, M., Khoo, C., Glad, H., Dahlqvist, C. y Juppo, A. Evaluation of controlled-release polar lipid microparticles. *International Journal of Pharmaceutics* **244**, 151–161 (2002).
- [362] Hernandez, C. *et al.* Lippia origanoides essential oil: an efficient and safe alternative to preserve food, cosmetic and pharmaceutical products. *Journal of Applied Microbiology* **122**, 900–910 (2017).
- [363] Boumbéwendin, J. *et al.* Pharmacokinetic study of intravenously administered artemisinin-loaded surface-decorated amphiphilic γ -cyclodextrin nanoparticles. *Materials Science and Engineering C* **106**, 110281; 1–6 (2020).
- [364] Honig, M. y Hume, R. Dil and DiO: versatile fluorescent dyes for neuronal labelling and pathway tracing. *Trends in Neurosciences* **12**, 333–341 (1989).
- [365] Kheradmandnia, S., Vasheghani-Farahani, E., Nosrati, M. y Atyabi, F. Preparation and characterization of ketoprofen-loaded solid lipid nanoparticles made from beeswax and carnauba wax. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **6**, 753–759 (2010).

- [366] Swainson, S. *et al.* Exploring the enzymatic degradation of poly(glycerol adipate). *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **142**, 377–386 (2019).
- [367] Iglesias, G., Reyes-Ortega, F., Checa-Fernandez, B. y Delgado, A. Hyperthermia-triggered gemcitabine release from polymer-coated magnetite nanoparticles. *Polymers* **10**, 269; 1–15 (2018).
- [368] Hu, X., Tian, J., Liu, T., Zhang, G. y Liu, S. Photo-triggered release of caged camptothecin prodrugs from dually responsive shell cross-linked micelles. *Macromolecules* **46**, 6243–6256 (2013).
- [369] Kundu, J. y Surh, Y. Nrf2-Keap1 signaling as a potential target for chemoprevention of inflammation-associated carcinogenesis. *Pharmaceutical Research* **27**, 999–1013 (2010).
- [370] Kaddah, S., Khreich, N., Kaddah, F., Charcosset, C. y Greige-Gerges, H. Cholesterol modulates the liposome membrane fluidity and permeability for a hydrophilic molecule. *Food and Chemical Toxicology* **113**, 40–48 (2018).
- [371] Son, G., Lee, B. y Cho, C. Mechanisms of drug release from advanced drug formulations such as polymeric-based drug-delivery systems and lipid nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Investigation* **47**, 287–296 (2017).
- [372] Tiyafoonchai, W., Tungpradit, W. y Plianbangchang, P. Formulation and characterization of curcuminoids loaded solid lipid nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* **337**, 299–306 (2007).
- [373] Weber, G. Why does cancer therapy lack effective anti-metastasis drugs? *Cancer Letters* **328**, 207–211 (2013).
- [374] Jindal, A. Nanocarriers for spleen targeting: anatomo-physiological considerations, formulation strategies and therapeutic potential. *Drug Delivery and Translational Research* **6**, 473–485 (2016).
- [375] Qi, J., Lu, Y. y Wu, W. Absorption, disposition and pharmacokinetics of solid lipid nanoparticles. *Current Drug Metabolism* **13**, 418–428 (2012).
- [376] Dobrovolskaia, M. y McNeil, S. Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nature Nanotechnology* **2**, 469–478 (2007).
- [377] Gustafson, H., Holt-Casper, D., Grainger, D. y Ghandehari, H. Nanoparticle uptake: The phagocyte problem. *Nano Today* **10**, 487–510 (2015).
- [378] Barbosa, R. *et al.* Solid lipid nanoparticles for dibucaine sustained release. *Pharmaceutics* **10**, 231; 1–17 (2018).
- [379] Trucillo, P., Campardelli, R. y Reverchon, E. Liposomes: From bangham to supercritical fluids. *Processes* **8**, 1022; 1–15 (2020).
- [380] Tas, F. Metastatic behavior in melanoma: Timing, pattern, survival, and influencing factors. *Journal of Oncology* **2012**, 1–9 (2012).
- [381] Lee, J. y Yeo, Y. Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers. *Chemical Engineering Science* **125**, 75–84 (2015).

- [382] Gómez-Cuadrado, L., Tracey, N., Ma, R., Qian, B. y Brunton, V. Mouse models of metastasis: progress and prospects. *Disease Models & Mechanisms* **10**, 1061–1074 (2017).
- [383] Blum, R. y Carter, S. Adriamycin. *Annals of Internal Medicine* **80**, 249–259 (1974).
- [384] Ma, P., Benhabbour, S., Feng, L. y Mumper, R. 2'-behenoyl-paclitaxel conjugate containing lipid nanoparticles for the treatment of metastatic breast cancer. *Cancer Letters* **334**, 253–262 (2013).
- [385] Prabhakar, U. *et al.* Challenges and key considerations of the enhanced permeability and retention effect for nanomedicine drug delivery in oncology. *Cancer Research* **73**, 2412–2417 (2013).
- [386] Shu, L. *et al.* Nanostructure of DiR-loaded solid lipid nanoparticles with potential bioimaging functions. *AAPS PharmSciTech* **21**, 321; 1–5 (2020).
- [387] Langevin, D. *et al.* Towards reproducible measurement of nanoparticle size using dynamic light scattering: Important controls and considerations. *NanoImpact* **10**, 161–167 (2018).
- [388] Gad, S. Repeat dose toxicity studies. *Pharmaceutical Sciences Encyclopedia: Drug Discovery, Development, and Manufacturing* 1–20 (2010).
- [389] Singh, N., Joshi, A. y Verma, G. In Grumezescu, A. M. (ed.) *Engineering of Nanobiomaterials* (Elsevier, 2016).
- [390] Matsuzaki, K. *et al.* Optical characterization of liposomes by right angle light scattering and turbidity measurement. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1467**, 219–226 (2000).
- [391] Jafari, M., Jones, A., Hikal, A., Williamson, J. y Wyandt, C. Characterization of drug release from liposomal formulations in ocular fluid. *Drug Delivery* **5**, 227–238 (1998).
- [392] Kulkarni, S., Singh, M. y Betageri, G. Encapsulation, stability and in vitro release characteristics of liposomal formulations of colchicine. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **49**, 491–495 (1997).
- [393] Loew, S., Fahr, A. y May, S. Modeling the release kinetics of poorly water-soluble drug molecules from liposomal nanocarriers. *Journal of Drug Delivery* **2011**, 1–10 (2011).
- [394] Jain, A. y Jain, S. In vitro release kinetics model fitting of liposomes: An insight. *Chemistry and Physics of Lipids* **201**, 28–40 (2016).
- [395] Costa, P. y Sousa-Lobo, J. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **13**, 123–133 (2001).
- [396] Fugit, K. *et al.* Mechanistic model and analysis of doxorubicin release from liposomal formulations. *Journal of Controlled Release* **217**, 82–91 (2015).
- [397] Panwar, P. y B. Pandey, K. S., P.C. Lakhera. Preparation, characterization, and in vitro release study of albendazole-encapsulated nanosize liposomes. *International Journal of Nanomedicine* **5**, 101–108 (2010).

- [398] Conlan, J. Early pathogenesis of listeria monocytogenes infection in the mouse spleen. *Journal of Medical Microbiology* **44**, 295–302 (1996).
- [399] Sobyatin, K., Sysolyatina, E., Chalenko, Y., Kalinin, E. y Ermolaeva, S. Route of injection affects the impact of InlB internalin domain variants on severity of Listeria monocytogenes Infection in mice. *BioMed Research International* **2017**, 1–8 (2017).
- [400] Wilkinson, T. y Hall, E. Survival of listeria monocytogenes in experimentally infected mice. *Applied microbiology* **21**, 108–111 (1971).

